

Universidade de Brasília
Faculdade UnB Planaltina
Programa de Pós Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural

TANIA MACHADO DA SILVA

**METALÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM
AMOSTRAS DE LEITE HUMANO COLETADAS DE LACTANTES RESIDENTES EM
COMUNIDADES DO ALTO RIO MADEIRA, RONDÔNIA, BRASIL**

BRASÍLIA

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE UNB PLANALTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO
RURAL

TANIA MACHADO DA SILVA

METALÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM
AMOSTRAS DE LEITE HUMANO COLETADAS EM COMUNIDADES DO ALTO RIO
MADEIRA, RONDÔNIA, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Meio Ambiente e
Desenvolvimento Rural da Universidade de Brasília.
Linha de Pesquisa: Monitoramento Ambiental e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fabrício Zara

BRASÍLIA
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586m Silva, Tania Machado da
Metalômica aplicada ao estudo de toxicidade do
mercúrio em amostras de leite humano coletadas de
lactantes residentes em comunidades do alto rio
Madeira, Rondônia, Brasil / Tania Machado da Silva;
orientador Luiz Fabrício Zara. -- Brasília, 2015.
116 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Meio Ambiente
e Desenvolvimento Rural) -- Universidade de Brasília,
2015.

1. Mercúrio. 2. Biomarcador. 3. Metalômica. 4.
Leite humano. 5. Eletroforese. I. Zara, Luiz
Fabrício, orient. II. Título.

TANIA MACHADO DA SILVA

METALÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE TOXICIDADE DO MERCÚRIO EM
AMOSTRAS DE LEITE HUMANO COLETADAS EM COMUNIDADES DO ALTO RIO
MADEIRA, RONDÔNIA, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Meio Ambiente e
Desenvolvimento Rural pelo Programa de Pós-
Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento
Rural da Universidade de Brasília.

Aprovado em 24 de Março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Fabrício Zara – Presidente da Banca
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Eduardo Cyrino de Oliveira Filho – Membro Efetivo
Embrapa Cerrados (EMBRAPA)

Prof. Dr. José Vicente Elias Bernardi – Membro Efetivo
Universidade de Brasília - UnB

Dedico este trabalho aos meus pais, por sempre me apoiarem em todas minhas escolhas e por terem sido peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou.

À minha irmã e meu irmão, pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei. Dedico também ao meu avô, Leonel (in memoriam), por todo o apoio até o último momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e coragem para percorrer esse caminho, apenas por meio Dele consegui concluir mais essa etapa em minha vida;

Agradeço aos meus pais, Nelson Ari e Eliane Saete, por todo incentivo, amor e dedicação; pelos valores e por terem me ensinado a andar com meus próprios pés; por sempre estarem presentes, mesmo que distantes fisicamente. Obrigada, sem dúvida vocês foram peça fundamental nesta conquista.

Agradeço ao meu avô Leonel (*in memoriam*), meu maior ídolo, e por que não dizer, meu maior fã; Obrigada vô, por cada minuto que dispôs a estar comigo, ouvindo-me e me proporcionando um aprendizado incomensurável através de suas experiências; obrigada pelo apoio que me destes e por sempre acreditar em minha capacidade.

Aos meus irmãos, Grasiela e Maurício, por sempre me apoiarem e torcerem por mim. Ao meu namorado, Fabrício, por estar ao meu lado, aguentando minhas lamentações, meus estresses, meus “surto” e, apesar de tudo, continuar acreditando em mim e me apoiando.

Aos colegas e amigos de laboratório, Cilene Padilha, Camila Braga, Wllyane Figueiredo, José Cavalcante, Alis Bittarello, João Vitor, Bruna Cavecci e Vânia, por todo auxílio em minhas análises, pelo incentivo nos momentos difíceis e pelas piadas que fizeram meus dias mais alegres.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Ao professor Dr. Luiz Fabrício Zara, orientador desta dissertação; pela confiança depositada em mim.

Ao professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, orientação e paciência.

À Venturo Consultoria Ambiental, pelo apoio nos trabalhos de campo e análises laboratoriais, assim como pela disponibilização de dados.

Ao Programa de P&D da Energia Sustentável do Brasil (ANEEL/PD-6631-0001/2012), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Por fim, considerando que este trabalho é resultado de uma longa caminhada, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

“Nunca ninguém se torna mestre num domínio em que não conheceu a impotência, e, quem aceita esta ideia, saberá também que tal impotência não se encontra nem no começo nem antes do esforço empreendido, mas sim no seu centro.”

Benjamin, Walter

AUXÍLIO FINANCEIRO

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



SÚMULA CURRICULAR (Período do mestrado: 2013-2014)

Dados pessoais

Tania Machado da Silva
Nascimento: 06/01/1991
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: Brasília/DF
Profissão: Gestora Ambiental

Formação acadêmica

2008-2012 Bacharel em Gestão Ambiental, Universidade de Brasília – UnB, Faculdade UnB Planaltina – FUP, Planaltina/DF.

Formação complementar

2013-2013 Legislação Ambiental. (Carga horária: 7h). Câmara dos Deputados.
2012-2012 AutoCAD Map 3D Básico. (Carga horária: 40h). ProSystems, CAD STUDIO Authorized Autodesk Training Center (ATC).
2012-2012 Introdução ao Sensoriamento Remoto. (Carga horária: 50h). Centro Científico Conhecer.
2010-2010 Construindo Geodatabase ArcGIS Desktop 9.3.1. (Carga horária: 24h). Academia GIS Imagem.
2009-2009 Introdução ao ArcGIS Desktop 9.3.1. (Carga horária: 40h). Academia GIS Imagem.

Prêmios e títulos

- Menção Honrosa, VII Encontro Nacional de Química Ambiental.

Produção científica

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

- **SILVA, T. M., FIGUEIREDO, W. S., BITTARELLO, A. C., CAVECCI, B., VIEIRA, J. C. S., ZARA, L. F., PADILHA, P. M.** Determinação de mercúrio total em amostras de leite de lactantes residentes no Alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN. **Anais do 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014.**

Resumos publicados em anais de congressos

- **SILVA, T. M., FIGUEIREDO, W. S., CAVECCI, B., VIEIRA, J. C. S., PADILHA, C. C. F., ZARA, L. F., PADILHA, P. M.** Estudo metaloproteômico quantitativo do mercúrio em amostras de leite de lactantes residentes no alto rio Madeira, Rondônia, Brasil. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília - DF. **Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014.**
- **OLIVEIRA, C. E. B., FIGUEIREDO, W. S., SILVA, T. M., ZARA, L. F., ROCHA, J. C.** Determinação de elementos traço em matrizes de interesse ambiental coletadas em áreas

localizadas na Bacia do alto rio Madeira – RO. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília - DF. **Livro de resumos do VII Encontro Nacional de Química Ambiental**, 2014.

- FIGUEIREDO, W. S., **SILVA, T. M.**, ZARA, L. F., S. JUNIOR, E., SANTOS, A., PADILHA, P. M., FRANZINI, V. P. Estudo quantitativo do mercúrio em tecido muscular de tucunarés. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília - DF. **Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Química Ambiental**, 2014.
- FIGUEIREDO, W. S., FRANZINI, V. P., **SILVA, T. M.**, ZARA, L. F., JARDIM, W. F., SANTOS, A., ROCHA, J. C. Estudo do processo de bioacumulação do mercúrio em tucunarés coletados na bacia dos rios Negro, Madeira e Tocantins. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN. **Anais da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014.
- **SILVA, T. M.**, FIGUEIREDO, W. S., PASSOS, C. J. S., ZARA, L. F. Avaliação dos níveis de exposição humana ao mercúrio (Hg) na população da área de influência do Aproveitamento Hidrelétrico de Jirau, Bacia do rio Madeira, Amazônia Ocidental Brasileira. In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2013.
- FIGUEIREDO, W. S., **SILVA, T. M.**, BERNARDI, J.V.E., ZARA, L. F., SANTOS, A., ROCHA, J. C., JARDIM, W. F. Monitoramento de mercúrio na ictiofauna na área de influência do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (UHE Jirau), Amazônia, Brasil. In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre - RS. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2013.
- ZARA, L. F., PASSOS, C. J. S., **SILVA, T. M.**, FIGUEIREDO, W. S., SERRA, C. V., SERRA, V. V., SIMOES, V. L. D., SANTOS, L. M. Biomonitoring of human mercury (Hg) exposure at the Jirau Hydroelectric Power Plant, Brazilian Amazon. In: XVII EuroAnalysis, 2013, Warsaw. **Anais do XVII EuroAnalysis**, 2013.
- SIQUEIRA, A. G., **SILVA, T. M.**, FIGUEIREDO, W. S., ZARA, L. F., CASTRO, G. R., BERNARDI, J.V.E. Total mercury (Hg) stock in sediments of the Jirau Hydroelectric Power Plant, Madeira River – Brazilian Amazon. In: XVII EuroAnalysis, 2013, Warsaw. **Anais do XVII EuroAnalysis**, 2013.
- **SILVA, T. M.**, SERRA, C. V., SERRA, V. V., SIMOES, V. L. D., SANTOS, L. M., FIGUEIREDO, W. S., PASSOS, C. J. S., ZARA, L. F. Biomonitoramento da exposição humana ao mercúrio (Hg) no Aproveitamento Hidrelétrico de Jirau, Amazônia, Brasil. In: 5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica e 2º Congresso Uruguayo de Química Analítica, 2012, Montevideo. **Química Analítica Toxicológica**, 2012. p.377 – 377
- FIGUEIREDO, W. S., **SILVA, T. M.**, BERNARDI, J.V.E., ZARA, L. F., SANTOS, A., ROCHA, J. C., JARDIM, W. F. Monitoramento de mercúrio no solo na área de influência do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (AHE Jirau), Amazônia, Brasil In: 5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica e 2º Congresso Uruguayo de Química Analítica, 2012, Montevideo. **Química Analítica Ambiental**, 2012. p.259 – 259.
- ZARA, L. F., BERNARDI, J.V.E., FIGUEIREDO, W. S., **SILVA, T. M.**, ROCHA, J. C., SANTOS, A., JARDIM, W. F. Biomonitoramento de Metilmercúrio na área de influência direta do aproveitamento hidrelétrico (AHE) Jirau - Rio Madeira/Amazônia - Barsil. In: IV Congresso Iberoamericano de Química Analítica e X Encuentro Nacional de Química Analítica e Ambiental, 2010, Cancón. **Bioindicadores de la contaminación ambiental**, 2010, p.75 – 75.

Apresentação oral de trabalhos em eventos científicos

- OLIVEIRA, C. E. B., FIGUEIREDO, W. S., **SILVA, T. M.**, ZARA, L. F., ROCHA, J. C. Determinação de elementos traço em matrizes de interesse ambiental coletadas em áreas localizadas na Bacia do alto rio Madeira – RO. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília - DF

Participação em eventos científicos

- 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014. (Congresso)
- VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014. (Encontro)
- XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013. (Congresso)
- 5º Congreso Iberoamericano de Química Analítica e 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica, 2012. (Congresso)

RESUMO

SILVA, TANIA MACHADO. **Metalômica aplicada ao estudo de toxicidade do mercúrio em amostras de leite humano coletadas em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, Brasil.** 2015. 116f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural) – Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

A avaliação toxicológica de substâncias químicas, como o mercúrio, demandam estudos relativamente longos. Apesar da eficiência destes estudos, recentes desafios têm demandado desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem melhor percepção dos mecanismos toxicológicos a fim de possibilitar previsões de toxicidade para diferentes cenários de exposição humana, o que tem gerado grande interesse em estudos relacionados à caracterização funcional e estrutural de proteínas assim como o fluxo dessas espécies no organismo. Neste contexto, buscou-se aqui identificar e quantificar possíveis biomarcadores proteicos da toxicidade do mercúrio em amostra de leite humano de lactantes residentes em comunidades tradicionais do alto rio Madeira, no intuito de elucidar os possíveis mecanismos de transporte do mercúrio. Para tanto, utilizou-se técnicas de proteômica/metalômica, tais como eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e quantificação do mercúrio por espectrometria de absorção atômica. O estudo contou com 9 participantes, entre o 20º e 70º dia de lactação. O perfil de consumo alimentar (principalmente fontes de proteína animal) foi determinado pela aplicação de um inquérito alimentar recordatório de 7 dias. As concentrações de mercúrio total (HgT) no cabelo foram determinadas por análise direta utilizando o equipamento por SMS 100. As amostras de leite foram digeridas em meio ácido e a determinação de HgT foi realizada por espectrometria de absorção atômica com amostrador automático e sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite. Por espectrometria atômica também foi possível analisar e quantificar o mercúrio presente nas bandas proteicas, obtidas no fracionamento das proteínas por SDS-PAGE, após mineralização ácida. As concentrações de HgT nas amostras de cabelo foram inferiores ao limite preconizado pela WHO ($14 \mu\text{g g}^{-1}$), assim como abaixo das médias gerais observadas em várias regiões da Amazônia, possivelmente devido ao baixo consumo de peixe pelos participantes. A ingestão de mercúrio pelo consumo de leite materno foi acima do limite tolerável (PTWI = $5 \mu\text{g/kg pc}$, ou $0,71 \mu\text{g/kg pc/dia}$ de Hg total) para 8 das 9 amostras de leite analisadas, entretanto, condizentes com os resultados para região amazônica. Apesar dos resultados mostrarem elevados

concentrações de HgT para 88% das amostras, o leite humano é essencial para o desenvolvimento neurológico do recém-nascido, sendo seus benefícios mais relevantes que os possíveis riscos decorrentes da presença de Hg. Os géis obtidos no fracionamento das proteínas por SDS-PAGE apresentaram alta diversidade de bandas proteicas, em média $33 \pm 2,8$ bandas por amostra. No mapeamento de mercúrio nestas bandas, observou-se maior percentagem de Hg nas bandas de baixa massa molar ($< 20,1$ kDa), indicando que proteínas com menor massa molar têm maior probabilidade de apresentarem mercúrio, e possivelmente, servirão como possíveis biomarcadoras do metal. Contudo, mais estudos nesta linha devem ser desenvolvidos para que se tenham maiores conclusões.

Palavras-chave: Mercúrio; biomarcador; metalômica; leite humano; eletroforese; SDS-PAGE.

ABSTRAT

SILVA, TANIA MACHADO. **Metalomic applied to Mercury toxicity study in human milk samples collected in the upper Madeira river communities, Rondônia, Brazil.** 2015. 116f. Dissertation (Master of Environment and Rural Development) – UnB College Planaltina, University of Brasília, Brasília, 2015.

The toxicological evaluation of chemical substances such as mercury, require relatively long studies. Despite the efficiency of these studies, recent challenges have demanded development of new techniques that enable better understanding of toxicological mechanisms to enable predictions of toxicity for different scenarios of human exposure, which has generated great interest in studies related to functional and structural characterization of proteins, as well as the flow of such species in the body. In this context, we sought to identify and quantify potential protein biomarkers of mercury toxicity in human milk sample of women living in traditional communities of the Madeira River, in order to elucidate the possible mercury transport mechanisms. Therefore, we used techniques of proteomics / metallomics, such as unidimensional electrophoresis (SDS-PAGE) and quantification of mercury by atomic absorption spectrometry. The study included 9 participants, between 20 and 70 days of lactation. The profile of food consumption (especially animal protein sources) was determined by applying a recall was 7 days. Total mercury concentrations (THg) in hair were determined by direct analysis using the equipment by SMS 100. Milk samples were digested in acid medium and determination of HgT was performed by atomic absorption spectrometry with autosampler and electrothermal atomization system graphite furnace. By atomic spectrometry was also possible to analyze and quantify the mercury present in the protein bands obtained in the fractionation of proteins by SDS-PAGE, after acid mineralization. Concentrations of THg in hair samples were below the limit recommended by WHO ($14 \mu\text{g g}^{-1}$) and below the overall averages observed in several regions of the Amazon, possibly due to the low consumption of fish by participants. The mercury intake by breast milk intake was above the tolerable limit (PTWI = $5 \mu\text{g/kg pc}$, ou $0,71 \mu\text{g/kg pc/dia total Hg}$) for 8 of the 9 milk samples analyzed, however, consistent with the results for the Amazon region. Although the results show high THg concentrations for 88% of the samples, human milk is essential for the neurological development of newborns, with its most important

benefits that the possible risks arising from the presence of Hg. The gels obtained from the fractionation of proteins by SDS-PAGE showed a high diversity of protein bands on average $33 \pm 2,8$ bands per sample. In the mercury-mapping these bands, there was a higher percentage of mercury in low molecular weight bands ($<20,1$ kDa), indicating that proteins with lower molecular weight are more likely to exhibit mercury and possibly serve as potential biomarkers of metal. However, further studies in this line should be developed to have larger conclusions.

Keywords: Mercury; biomarker; metallomics; human milk; electrophoresis; SDS-PAGE.

RESUMEN

SILVA, TANIA MACHADO. **Metalômica aplicado al estudio de la toxicidad del mercurio en las muestras de leche humana recogidas en las comunidades alto río Madeira, Rondônia, Brasil.** 2015. 116f. Disertación (Maestría en Medio Ambiente y Desarrollo Rural) - UNB Facultad Planaltina, Universidad de Brasilia, Brasilia, 2015.

La evaluación toxicológica de sustancias químicas tales como mercurio, requiere estudios relativamente largos. A pesar de la eficacia de estos estudios, los desafíos recientes han exigido el desarrollo de nuevas técnicas que permiten una mejor comprensión de los mecanismos toxicológicos para permitir predicciones de toxicidad para diferentes escenarios de exposición humana, lo que ha generado un gran interés en los estudios relacionados con la caracterización funcional y estructural de proteínas, así como el flujo de tales especies en el cuerpo. En este contexto, hemos tratado de identificar y cuantificar posibles aquí biomarcadores de proteínas de la toxicidad del mercurio en la muestra de la leche materna de las mujeres que viven en comunidades tradicionales de la parte alta del Río Madeira, con el fin de dilucidar los posibles mecanismos de transporte de mercurio. Por lo tanto, hemos utilizado técnicas de proteómica / metalômica, tales como electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) y la cuantificación de mercurio por espectrometría de absorción atómica. El estudio incluyó a 9 de los participantes, entre los días 20 y 70 de la lactancia. El perfil de consumo de alimentos (especialmente las fuentes de proteína animal) se determina aplicando un retiro fue de 7 días. Las concentraciones de mercurio total (THg) en el cabello se determinaron mediante el análisis directo de utilizar el equipo por SMS 100. Las muestras de leche fueron digeridos en medio ácido y la determinación de THg se realizó mediante espectrometría de absorción atómica con inyector automático y sistema de atomización horno de grafito electrotérmico. Por espectrometría atómica también fue posible analizar y cuantificar el mercurio presente en las bandas de proteínas obtenidos en el fraccionamiento de proteínas por SDS-PAGE, después de la mineralización ácida. Las concentraciones de Hg total en muestras de cabello estaban por debajo del límite recomendado por la OMS ($14 \mu\text{g g}^{-1}$) y por debajo de los promedios generales observados en varias regiones de la Amazonía, posiblemente debido al bajo consumo de pescado por los participantes. La ingesta de mercurio por la ingesta de leche materna estaba por encima del límite tolerable (ISTP = $5 \mu\text{g/kg pc}$, ou $0,71 \mu\text{g/kg pc/día}$ de

THg) para 8 de las 9 muestras de leche analizadas, sin embargo, de acuerdo con los resultados para la región amazónica. Aunque los resultados muestran altas concentraciones THg el 88% de las muestras, la leche materna es esencial para el desarrollo neurológico de los recién nacidos, con sus beneficios más importantes que los posibles riesgos derivados de la presencia de Hg. Los geles obtenidos a partir del fraccionamiento de proteínas por SDS-PAGE mostraron una alta diversidad de bandas de proteína en promedio $33 \pm 2,8$ bandas por muestra. En las mapeo de estas bandas, hubo un mayor porcentaje de mercurio en bandas de bajo peso molecular ($<20,1$ kDa), lo que indica que las proteínas con peso molecular más bajo son más propensas a exhibir mercurio y posiblemente servir como potenciales biomarcadores de metal. Sin embargo, más estudios en esta línea deben ser desarrollados para tener conclusiones más grandes.

Palabras clave: Mercurio; biomarcadores; metalómica; leche materna; electroforesis; SDS-PAGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio.	29
Figura 2 – Exemplificação do processo de biomagnificação do Hg no ambiente aquático.....	30
Figura 3 – Mapeamento das localidades onde foram feitas as amostragens.	49
Figura 4 – Coleta de amostras de cabelo.....	51
Figura 5 – Coleta de amostras de leite materno.....	51
Figura 6 – Sistema de eletroforese – SDS-PAGE.	56
Figura 7 – Frequência no consumo de carne de gado, frango e peixe, pelas participantes nos últimos 7 dias à entrevista.	61
Figura 8 – Distribuição das concentrações de HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.....	62
Figura 9 – Correlação entre as concentrações de HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$) em cabelo humano e a frequência de consumo de peixe (Spearman, $p < 0,18$).	63
Figura 10 – Distribuição das concentrações de HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	65
Figura 11 – Géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtidos por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, nas condições otimizadas para a massa de proteínas aplicada.	69
Figura 12 – Curvas de calibração da proteína em função da distância de migração.	70
Figura 13 – Detecção das bandas proteicas em géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtidos por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	70
Figura 14 – Eletroforetograma das bandas obtidas em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE) – Gel 1.	71
Figura 15 – Eletroforetograma das bandas obtidas em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE) – Gel 2.	71
Figura 16 – Distribuição das concentrações de HgT (mg g^{-1}) nas bandas proteínas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	74

Figura 17 – Distribuição das concentrações de Hg total (mg g^{-1}) em bandas proteínas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, estratificadas por faixas de massa molar (< 15 ; $< 15 < 20.1$; >20.1 ; e < 30 ; > 30 kDa).	75
Figura 18 – Dispersão da concentração de HgT (mg g^{-1}) em função da massa de proteína (μg) das bandas proteínas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.....	76
Figura 19 – Dispersão da concentração de HgT (mg g^{-1}) em função da massa molar (kDa) das bandas proteínas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das concentrações de Hg em cabelo, relatados para comunidades consumidoras de peixe na Bacia Amazônica, com a localização, característica da população estudada, faixa de idade, número amostral e referência.	38
Tabela 2 – Resumo das concentrações de HgT em leite humano, de acordo com literatura científica especializada, publicadas no período de 1998 a 2013, com a localização, número amostral, período de lactação e referência.	39
Tabela 3 – Localização das comunidades, identificação e tempo de lactação de cada lactante no momento da coleta.	50
Tabela 4 – Volume das soluções intermediárias de Hg de 0,1 e 1,0 mg L ⁻¹ utilizado no preparo da curva analítica para os intervalos alto e baixo; e respectivos tempo de secagem.	53
Tabela 5 – Programação de aquecimento do tubo de grafite para determinação de HgT nos extratos ácidos obtidos das mineralizações das amostras de leite in-natura e bandas proteicas. ..	54
Tabela 6 – Programação da SDS-PAGE para separação das proteínas.	57
Tabela 7 – Amostras aplicadas nos géis de poliacrilamida para corridas eletroforética.	57
Tabela 8 – Concentração de HgT (µg g ⁻¹) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	62
Tabela 9 – Concentrações de HgT (µg L ⁻¹) em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	64
Tabela 10 – Concentração total de proteínas em extratos de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.	67
Tabela 11 – Concentração de HgT, massa molar e massa de proteínas das bandas proteicas obtidas por SDS-PAGE.	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2D – Duas dimensões

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

BG – Background

Da – Dalton (1 Da = 1,661 x 10⁻²⁴g)

DTT – 1,4-ditiotreitol

EtHg – Etilmercúrio

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

Hg – Mercúrio

Hg⁺² – Mercúrio iônico ou mercúrico

Hg⁰ – Mercúrio metálico ou elementar

HgT – Mercúrio Total

HNO₃ – Ácido nítrico

JECFA – *Joint Expert Committee on Food Aditives*

kDa - QuiloDalton (1 Da = 1,661 x 10⁻²⁴g)

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MeHg – Metilmercúrio

MM - Massa molar

MME – Ministério de Minas e Energia

MTs – Metalotioneínas

pc – Peso corpóreo

PTWI – *Provisional tolerable weekly intake*

Rf – Mobilidade relativa

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão

spot – Banda 2D de proteínas

TEMED – N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina

Tris-HCl – tris(hidroximetil)aminometano ácido

UHE – Usina Hidrelétrica

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	18
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	21
1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1. OCUPAÇÃO DA REGIÃO AMAZÔNICA E CONSEQUENTE DISPONIBILIZAÇÃO DE MERCÚRIO	26
2.2. MERCÚRIO	28
2.2.1. Exposição ao mercúrio	30
2.2.1.1. Rotas de Exposição ao Mercúrio e Implicações à Saúde.....	31
2.2.1.2. Exposição Materna: Riscos ao Recém-Nascido	34
2.2.2. Biomonitoramento do mercúrio	36
2.2.2.1. Biomarcadores.....	40
2.3. METALÔMICA.....	41
2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
3. OBJETIVOS.....	46
3.1. OBJETIVO GERAL.....	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	46
4.2. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	47
4.3. ÁREA DE ESTUDO	48
4.4. COLETA DE AMOSTRA.....	50
4.4.1. Coleta de cabelo	50
4.4.2. Coleta de leite materno	51
4.5. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL	51
4.5.1. Preparo de Amostras	51
4.5.1.1. Preparo das Amostras de Cabelo.....	51
4.5.1.2. Mineralização das Amostras de Leite Materno.....	52

4.5.1.3. Mineralização das Bandas Proteicas.....	52
4.5.2. Determinação de mercúrio total em cabelo	52
4.5.2.1. Preparo da Curva de Calibração	53
4.5.3. Determinação de mercúrio total em leite materno e bandas proteicas	53
4.5.3.1. Preparo da Curva Analítica	54
4.6. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS	55
4.6.1. Extração de proteínas.....	55
4.6.2. Determinação de proteínas totais.....	55
4.6.3. Separação eletroforética por SDS-PAGE	55
4.6.4. Tratamento de imagens	57
4.6.4.1. Estimativa da Mobilidade Relativa (Rf) e Massa Molecular	58
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	59
5.1.1. Hábito alimentar.....	60
5.2. EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO	61
5.2.1. Mercúrio total no cabelo	61
5.2.2. Mercúrio total no leite materno	64
5.3. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS	67
5.3.1. Determinação de proteínas totais.....	67
5.3.2. Separação eletroforética	68
5.3.3. Determinação de mercúrio total nas bandas proteicas	71
6. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES.....	95
ANEXOS	116

1. INTRODUÇÃO

A ocupação indiscriminada da região Amazônica, seja para agricultura, pecuária, garimpo ou geração de energia elétrica, pode ocasionar a remobilização e disponibilização de grandes quantidades de mercúrio (Hg) para o ambiente. Por se tratar de um metal conhecidamente tóxico, a presença do Hg no ambiente pode ser considerada uma ameaça para a estabilidade dos ecossistemas (ZOLFAGHARI et al., 2007). Sua forma orgânica, em especial o metilmercúrio (MeHg), é extremamente tóxica ao ser humano, afetando principalmente o sistema nervoso central (FARINA et al., 2013).

Dentre os contaminantes ambientais, o Hg apresenta a maior toxicidade e é o único capaz de sofrer biomagnificação em quase todas as cadeias alimentares (LACERDA & MALM, 2008). Dessa forma, apesar dos diversos benefícios do peixe como alimento, alguns estudos têm mostrado que sua ingestão é a principal via de exposição humana ao metilmercúrio (MeHg) no meio ambiente natural, tanto na Amazônia (BASTOS et al., 2008, MAILMAN et al., 2005) como no mundo (ZHANG & WONG, 2007, BARBIERI & GARDON, 2009). Comunidades como as da região amazônica, que têm o peixe como importante fonte de proteína animal, estão diariamente expostas a este metal (BASTOS et al., 2008; PASSOS & MERGLER, 2008; SILVA et al., 2011). Além disso, o Hg pode ser transferido através do aleitamento materno (SUNDBERG et al., 1999), podendo causar danos aos recém-nascidos, os quais ainda se encontram em desenvolvimento neurológico e, por isso, são mais suscetíveis aos efeitos do Hg quando comparadas aos adultos (MOLINA-VILLALBA et al., 2015).

Dessa forma, estudos de metais, como o Hg, em humanos são essenciais para compreensão de sua toxicologia, impacto e comportamento em sistemas biológicos (GAO et al., 2003; GARCIA et al., 2006). Contudo, a avaliação toxicológica de substâncias químicas depende de estudos relativamente longos, como ensaios *in vitro* e identificação de doses de exposição em animais. Embora essas abordagens toxicológicas sejam eficientes em seus objetivos, recentes desafios têm demandado desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem melhor percepção dos mecanismos toxicológicos a fim de possibilitar previsões de toxicidade para diferentes cenários de exposição humana (TITZ et al., 2014).

Neste contexto, estudos relacionados à caracterização funcional e estrutural de proteínas assim como o fluxo dessas espécies no organismo têm gerado grande interesse no âmbito acadêmico (MORAES et al., 2014; POZZI et al., 2015). A proteômica, por exemplo, busca

caracterizar a interação de proteínas distintas e suas funções como parte de um sistema maior (GOMÉZ-ARIZA et al., 2004). Estudos nesta área permitem a separação, identificação e medição quantitativa de proteínas, análises sequenciais, estudos da estrutura e de interações entre proteínas (POMASTOWSKI et al., 2014; ROTILIO et al., 2012).

Em complemento, a metalômica, área científica relativamente nova, combina técnicas de proteômica com técnicas de análise, tais como espectrometria atômica, buscando aumentar a compreensão de questões biológicas e ambientais relacionadas aos íons metálicos (GOMÉZ-ARIZA et al., 2004; POZZI et al., 2015).

Estudos metalômicos em organismos vivos podem fornecer informações sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, da sua essencialidade e/ou toxicidade, como também da concentração individual da espécie metálica contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas.

Neste contexto, este estudo teve por objetivo a identificação de possíveis biomarcadores da toxicidade do Hg por meio do estudo metalômico, em amostras de leite de lactantes residentes em comunidades tradicionais do alto rio Madeira na área de influência da Usina Hidrelétrica (UHE) Jirau, os quais poderão ser aplicáveis a programas robustos de biomonitoramento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OCUPAÇÃO DA REGIÃO AMAZÔNICA E CONSEQUENTE DISPONIBILIZAÇÃO DE MERCÚRIO

A ocupação na Amazônia brasileira foi intensificada na década de 1960 em decorrência de projetos de colonização e da política de integração nacional dos militares, quando a Revolução Verde foi implantada e financiada pelos governos militares provocando profundas mudanças na base produtiva da agricultura no Brasil (SAUER, 2010). Neste período um novo modelo hegemônico de desenvolvimento agrícola foi inserido na sociedade, baseado em métodos produtivos industriais, com a implantação de um pacote de técnicas e lógicas produtivas fundamentadas na química, na mecânica e na genética (SAUER & BALESTRO, 2010).

Este novo modelo de desenvolvimento agrícola permitiu considerável aumento na produção de alimento para o mercado interno e para as exportações, contribuindo para a balança econômica brasileira. Entretanto, o mesmo tem gerado considerável impacto ao ambiente, à saúde e ao bem-estar da população (SAUER & BALESTRO, 2010).

Essa ocupação e conseqüente desmatamento em várias regiões da Amazônia foram também impulsionados pela pecuária de média e grande escala (MARGULIS, 2003). Associada a essas atividades, desde a década de 1970, várias técnicas de extração de ouro, utilizando amalgamação com Hg, foram desenvolvidas na Bacia Amazônica (AMORIM et al, 2000). Em meados da década de 1990, grande parte do ouro produzido no Brasil era proveniente de garimpos distribuídos principalmente nessa região, cerca de duas mil áreas eram operadas por garimpeiros pouco organizados. Estimavam-se reservas totais de ouro na região de, no mínimo, 25 toneladas, equivalente a cerca de US\$ 300 bilhões (LACERDA, 1997).

Dentre diversos impactos decorrentes da ocupação indiscriminada, seguida pelo desmatamento e conversão dos solos para diferentes usos, tem-se a remobilização de grandes quantidades de Hg e a conseqüente disponibilização deste para corpos aquáticos, podendo acarretar efeitos deletérios à saúde humana (BASTOS et al, 2007; LACERDA & OLAF, 2008; MARQUES et al., 2010).

A princípio acreditava-se que grande parte do Hg na Amazônia era proveniente de sua utilização no garimpo, contudo, em meados dos anos 1990, estudos como o de Roulet et al. (1998) indicaram que os solos da amazônicos são naturalmente abundantes em Hg, o que contribui para o aumento de suas concentrações e disponibilização decorrente de sua mobilização (FADINI & JARDIM, 2001; GRIMALD et al., 2008; HACON at al., 2008; ROULET et al., 1998).

A Amazônia também tem sido bastante visada para a produção de hidroeletricidade (TUNDISI, 2007). Devido a seu grande potencial hidráulico e ao notável crescimento econômico brasileiro em âmbito internacional, que tem gerado grandes pressões no sistema energético do país (SOUZA, 2008), o governo lançou em 2011 o Programa Decenal de Expansão de Energia, o qual prevê a construção de 30 novas barragens na Amazônia legal até 2020 (BRASIL, MME, 2011), com prorrogação de barragens menores para depois de 2021 (BRASIL, MME, 2012). Duas das grandes barragens previstas neste Programa para a região Amazônica veem sendo construídas no rio Madeira, importante afluente da Bacia Amazônica, as Usinas Hidrelétricas Santo Antônio e Jirau, que atualmente se encontram em fase de operação, gerando energia deste dezembro de 2011 na UHE Santo Antônio, e setembro de 2013 na UHE Jirau (FEARNSIDE, 2014).

Diversos estudos têm mostrado que inundações para construção de reservatórios podem provocar o aumento das concentrações de MeHg nos peixes, o que conseqüentemente reflete em toda a cadeia alimentar do ecossistema alterado (HUGUET et al., 2010; MAILMAN et al., 2006), podendo assim acarretar danos também à saúde humana. Dessa forma, a construção de reservatórios na região amazônica pode provocar consideráveis impactos, tanto na integridade dos ecossistemas quanto na saúde das populações humanas locais, e, em conjunto com as outras formas de ocupação indiscriminadas, agravar a contaminação por Hg na região (LACERDA & OLAF, 2008).

2.2. MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) é um metal líquido branco-prateado, inodoro e de fácil volatilização, podendo ser encontrado em três formas: mercúrio metálico/elementar (Hg^0), sais inorgânicos (Hg^{2+} e Hg^+) e mercúrio orgânico (metilmercúrio – CH_3Hg^+ e etilmercúrio - $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}^+$). (LIMA et al., 2009). Pode ser disponibilizado ao ambiente por fontes naturais, como eventos tectônicos, erupções vulcânicas e ressuspensão de partículas do solo (SIQUEIRA & APRILE, 2012); ou fontes antrópicas, tais como a queima de combustíveis fósseis, produção de acetaldeído, incineração de resíduos sólidos, agrotóxicos, lâmpadas de vapor de Hg, baterias, produtos odontológicos e amalgamação de Hg com ouro (MICARONI et al., 2000).

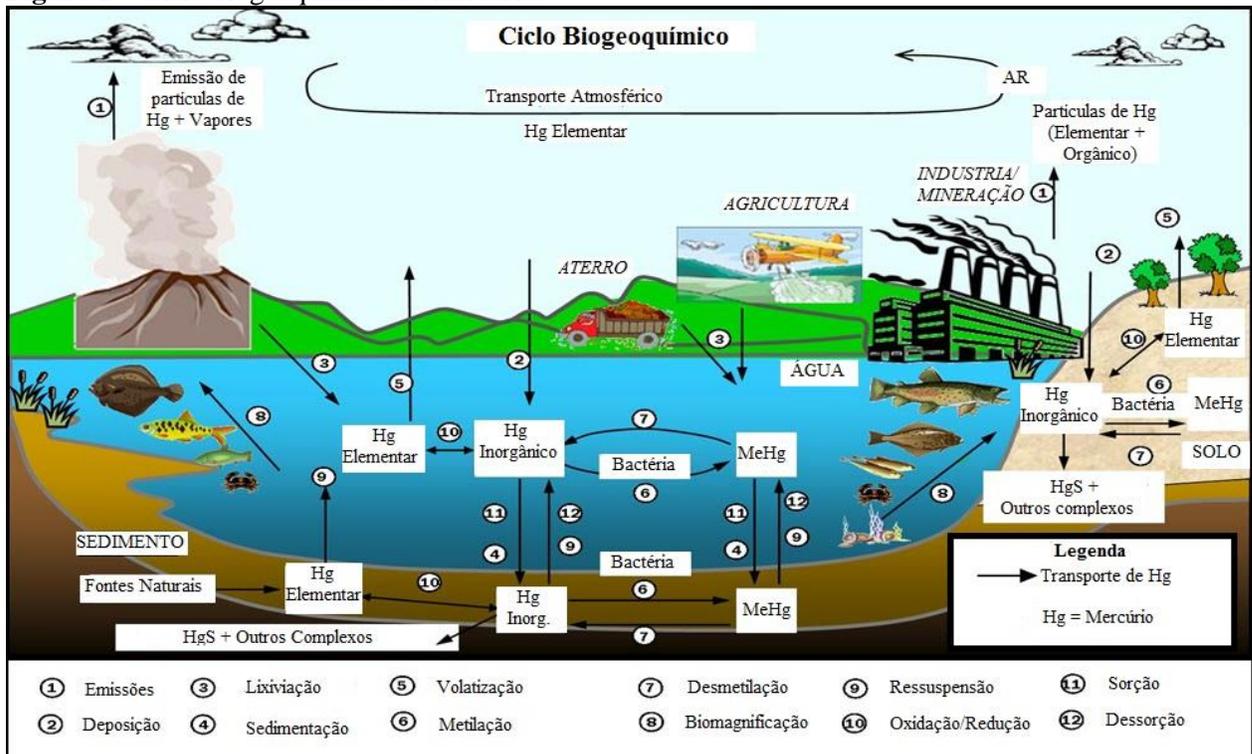
Trata-se de um elemento traço onipresente (SANTOS-FRANCÉS et al., 2011; SYVERSEN et al., 2012), sendo seu ciclo biogeoquímico (**Figura 1**) caracterizado por suas várias rotas nos diferentes compartimento ambientais (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Ao ser liberado na atmosfera, o Hg pode ser transportado por grandes distâncias devido sua estabilidade química, sendo que no ciclo atmosférico este metal é retido por longos períodos, e posteriormente depositado no solo, oceanos, lagos e rios (ARTAXO et al., 2000; LACERDA & OLAF, 2008).

Em áreas contaminadas, seja por fontes naturais ou antrópicas, o Hg presente na atmosfera ou solos é depositado e/ou transportados para corpos aquáticos e neste ambiente pode sofrer o processo de metilação, o qual aumenta de forma expressiva sua biodisponibilidade e acumulação ao longo da cadeia alimentar. Este processo ocorre principalmente em ambientes anóxicos ou subóxicos, com concentrações elevadas de matéria orgânica dissolvida e intensa atividade

microbiológica, características comumente encontradas em lagos e reservatórios artificiais (LACERDA & OLAF, 2008).

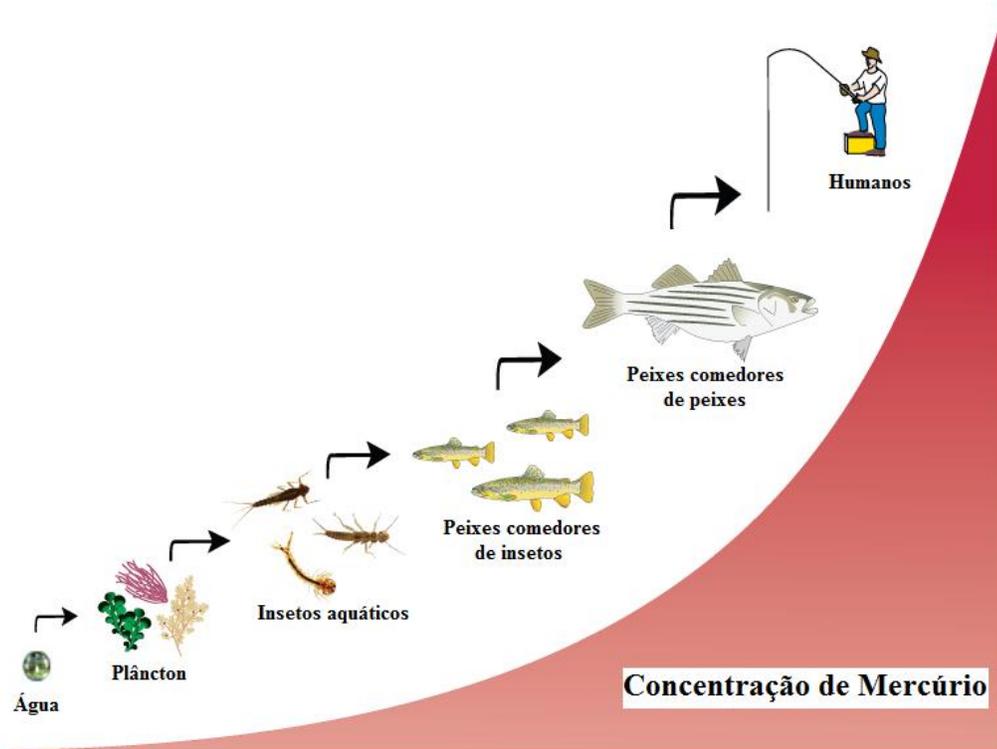
Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio.



Fonte: Site Ministry for the Environment/Manatu Mo Te Taiao, New Zealand (2008) – Adaptado.

O MeHg, proveniente do processo de metilação, é extremamente tóxico aos seres humanos. Devido sua lipossolubilidade, é facilmente absorvido por membranas biológicas e pelo trato digestivo de várias espécies, facilitando sua permanência e transporte em ambientes aquáticos, assim como sua bioacumulação, isto é, seu acúmulo no organismo. Além disso, o MeHg é capaz de sofrer biomagnificação na cadeia alimentar (**Figura 2**), ou seja, aumenta sua concentração em função do nível trófico, o que intensifica seus efeitos sobre os ecossistemas e a saúde humana (LACERDA & OLAF, 2008).

Figura 2 – Exemplificação do processo de biomagnificação do Hg no ambiente aquático.



Fonte: Site NAIADS (2013) – Adaptado

2.2.1. Exposição ao mercúrio

A exposição humana a agentes tóxicos, como Hg, mesmo que em baixas doses, tem se tornado um sério problema de saúde pública, tendo em vista seu potencial de acumulação (MOLINA-VILLALBA et al., 2015). Em 2013 vários países reconheceram o potencial tóxico deste poluente global na Convenção de Minamata sobre o Mercúrio (UNEP, 2013), cujo objetivo foi a redução da exposição humana ao Hg (BASU et al., 2014).

Apesar da atual iniciativa mundial frente aos riscos gerados pela exposição ao mercúrio, seus efeitos tóxicos são há muito tempo conhecidos, registrados até mesmo em personagens de histórias infantis, como o Chapeleiro Maluco, da obra Alice no País das Maravilhas de Lewis Carrol, o qual foi baseado em chapeleiros do século XIX, que usavam compostos de Hg na confecção do feltro dos chapéus e acabavam sofrendo de sintomas do conhecido mercurismo (SKOOG et al., 2006).

Considerado uma ameaça para a estabilidade dos ecossistemas (ZOLFAGHARI et al., 2007), o Hg é o único metal que reconhecidamente causou óbitos em humanos em razão de

contaminação por via ambiental (LACERDA & OLAF, 2008). Sua forma orgânica, em especial o MeHg, é tóxica ao ser humano, afetando principalmente o sistema nervoso central.

Embora estudos registrem alguns danos morfológicos à biota aquática, induzidos por Hg, principalmente no que se refere a efeitos sobre o processo reprodutivo de peixes, ainda se tem pouco conhecimento a respeito do impacto toxicológico do metilmercúrio sobre o crescimento e a sobrevivência de peixes (RIBEIRO et al., 2008; THE MADISON DECLARATION ON MERCURY POLLUTION, 2007).

Os cenários de exposição humana ao Hg podem variar em função de sua magnitude e duração, podendo apresentar caráter crônico ou agudo. A exposição a altas concentrações de Hg (exposição aguda) ocorre principalmente quando o indivíduo se encontra em locais confinados de trabalho (FARIA, 2003) ou em acidentes ambientais, como no caso da “Doença de Minamata”, em 1953, a qual levou ao óbito 1.043 pessoas e deixou 2.252 contaminadas por Hg, cerca de 12.127 pessoas também afirmaram ter a doença (BISINOTE & JARDIM, 2004; SAKAMOTO et al., 2001).

Por outro lado, muitas doenças causadas por substâncias tóxicas podem levar décadas para se desenvolverem, sendo desencadeada pela exposição precoce do indivíduo (exposição crônica), como no caso de crianças e adultos que se alimentam de peixes contaminados com o metal. A exposição ambiental ao Hg é caracterizada por baixas doses, quando comparadas a acidentes ambientais, e de caráter crônico (GUIMARÃES & ASMOS, 2010).

Por se tratar de um metal presente em todos os compartimentos ambientais, há todo momento o ser humano está exposto ao Hg, seja pelo ar, água ou alimentos, ou seja, por várias rotas de exposição.

2.2.1.1. Rotas de Exposição ao Mercúrio e Implicações à Saúde

A composição química do Hg influencia diretamente em seus aspectos toxicológicos de absorção, transporte e excreção, além de determinar seus principais órgãos-alvo (FARINA et al., 2013; LIMA et al., 2009; SYVERSEN et al. 2012). Dentre as principais formas de absorção de substâncias químicas têm-se: absorção dérmica, inalação ou ingestão, podendo ser eliminadas sem transformação, armazenadas e excretadas lentamente, metabolizada e excretada, ou uma combinação de todos estes processos (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009).

No caso do Hg^0 , quando absorvido, sua maior parte é oxidada no sangue para Hg^+ e Hg^{2+} (FARINA et al., 2013), tendo como alvo vários órgãos como rins, pulmão, trato gastrointestinal, fígado, medula óssea e o sistema nervoso central, podendo gerar sintomas neuropsíquicos, tais como cefaleia, perda de memória e depressão, além de alterações imunológicas (LIMA et al., 2009).

A exposição ao Hg^0 ocorre principalmente pela inalação de vapores, por se tratar de uma espécie volátil à temperatura ambiente. O indivíduo pode ser exposto a essa espécie mercurial tanto em laboratórios e locais de trabalho que fazem uso desse metal (indústria e garimpo de ouro), quanto em sua própria residência, devido ao uso de Hg em objetos, como termômetros e lâmpadas. Contudo, a utilização dessa espécie mercurial foi bastante reduzida globalmente (FARINA et al., 2013; SYVERSEN et al. 2012). O mercúrio líquido também é bastante utilizado no garimpo nos processos de pré-concentração e extração do minério de ouro por amalgamação (LIMA et al., 2009). A amalgama formada é aquecida, para sua extração, liberando vapor de Hg. Estudos mostram que pessoas que trabalham no garimpo de ouro apresentam maiores concentrações de Hg quando comparadas àquelas que vivem em áreas expostas ao metal. Isso porque a principal via de contaminação desses mineiros é a inalação direta de vapor (BAEUM et al., 2011; STRAATEM, 2000).

As espécies inorgânicas estão presentes principalmente na fórmula de produtos médicos e cosméticos. A utilização desses produtos pode causar o acúmulo desse metal no organismo do indivíduo exposto, sendo os principais alvos os rins e fígado, além da possibilidade de doenças autoimunes (SYVERSEN et al. 2012). Entretanto, Hg inorgânico é expelido cerca de dez vezes mais rápido que o Hg orgânico, isso porque é relativamente insolúvel nos tecidos e fluidos corporais (SKOOG et al., 2006), além disso, a lipossolubilidade dos compostos organomercuriais facilita sua absorção (WHO, 1989)

Dentre as espécies de Hg orgânico que ocorrem naturalmente no ambiente, o MeHg é o mais abundante, podendo ser encontrado em vários compartimentos. Essa espécie mercurial deriva da metilação de Hg inorgânico, a qual ocorre via processos envolvendo bactérias anaeróbicas presentes nos sedimentos de ambientes aquáticos (DÓREA et al., 2013; FARINA et al., 2013). À medida que é transferido na cadeia alimentar desde micróbios até grandes predadores, o MeHg sofre um processo de biomagnificação, ficando cada vez mais concentrado e

atingido altas concentrações no topo da cadeia alimentar (FARINA et al., 2013; SKOOG et al., 2006; SYVERSEN et al. 2012).

Alguns estudos têm apontado o consumo de peixe contaminado como principal fonte de exposição humana ao MeHg (BASTOS et al., 2008; BARBIERI & GARDON, 2009; GARCÍA-ESQUINAS et al., 2013; KHOURY et al., 2013; MAILMAN et al., 2006; PASSOS & MERGLER, 2008; SYVERSEN et al. 2012). Segundo Zhang & Wong (2007) o consumo de peixe contribui com mais de 97% da ingestão de Hg. Contudo, apesar de ser considerada a principal fonte de exposição ao MeHg, a carne do peixe contém nutrientes, como o selênio, que podem neutralizar toxicidade dessa espécie mercurial formando complexos inertes, além de outros, como ômega-3, que podem aumentar o desenvolvimento do cérebro (DÓREA et al., 2013; SYVERSEN et al. 2012). Dessa forma, qualquer restrição ao consumo dessa fonte de proteína deve também considerar seus efeitos benéficos.

Cerca de 95% do MeHg é absorvido pelo trato gastrointestinal (FARINA et al., 2013), após sua absorção, pode demorar até 6 dias para ser distribuído no organismo (BISINOTI & JARDIM, 2004), sendo o sistema nervoso central o principal alvo dessa espécie mercurial (FARINA et al., 2013; KHOURY et al., 2013). Devido sua afinidade com o cérebro, a concentração de MeHg neste órgão é de 3 a 6 vezes mais elevada que no sangue e uniformemente distribuída no resto do corpo (SYVERSEN et al. 2012). Sua meia-vida biológica em seres humanos é de 44 a 80 dias, o que é considerado um tempo relativamente longo. Sua excreção ocorre pelas fezes, urina e leite materno (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Por possuir átomos monovalentes, com propriedades eletrofílicas, o MeHg interage com grupos nucleofílicos de várias biomoléculas e os oxida. Assim, a mediação dessa espécie no organismo ocorre por sua interação com proteínas contendo grupos sulfidrila ou tióis não proteicos, por exemplo. Essas interações podem modificar o estado de oxidação desses grupos e consequentemente, modular suas funções (FARINA et al., 2013; SYVERSEN et al. 2012). Dentre os sintomas decorrentes da exposição a essa espécie mercurial tem-se: distúrbios visuais, parestesia, perda de audição, deterioração mental, tremor muscular, neurestenia, entre outros, e em alguns casos pode levar ao óbito (BISINOTI & JARDIM, 2004).

2.2.1.2. Exposição Materna: Riscos ao Recém-Nascido

Além das diversas fontes de exposição ao Hg, o contato com este metal pode ocorrer ainda no período fetal, tendo em vista que durante a gravidez não existe qualquer barreira que impeça a transmissão de Hg da mãe para o feto (KOZIKOWSKA & BINKOWSKI, 2013). Neste período, mesmo pequenas doses são perigosas, o que torna a exposição materna na fase gestacional um risco à saúde do feto, podendo provocar déficits neurológico (DÓREA et al., 2013; FARINA et al., 2013; GARCÍA-ESQUINAS et al., 2013; MOLINA-VILLALBA et al., 2015), hipertensão induzida pela gravidez, baixo peso do recém-nascido e deficiências físicas (GARCÍA-ESQUINAS et al., 2013).

A transferência da mãe para o feto ocorre de forma ativa a partir do sangue materno, atingindo o cérebro do feto (FARINA et al., 2013). A concentração no sangue fetal é geralmente mais elevada do que da mãe (SYVERSEN et al. 2012).

Kozikowska & Binkowski (2013) avaliaram a concentração de Hg na placenta, cordão umbilical, sangue do cordão umbilical e líquido amniótico de 40 mulheres que vivem na Polônia. As concentrações mais elevadas foram observadas em tecido de placenta ($0,104 \text{ ug g}^{-1}$) e no cordão umbilical ($0,064 \text{ ug g}^{-1}$), sendo semelhantes os valores médios do sangue, placenta e cordão umbilical. A alta concentração de Hg na placenta foi explicada pelo nível de hemoglobina em fetos ser mais elevados do que em suas mães e pela maior susceptibilidade das crianças ao acúmulo de Hg.

Além da exposição fetal, o Hg pode ser transferido para o recém-nascido através do aleitamento (SUNDBERG et al., 1999). Durante os primeiros seis meses de vida o aleitamento pode reduzir as taxas de mortalidade infantil, além de proteger contra uma variedade de doenças, sendo de fundamental importância para desenvolvimento físico, imunológico e neurocomportamental da criança (ANVISA, 2008; CUNHA et al., 2013; JAKAITS et al., 2014; MANDAL et al., 2014; MARTÍN et al., 2004; POZZI et al., 2015; VIEIRA et al., 2013). Contudo, o leite é uma via de excreção em mamíferos (CUNHA et al., 2013), juntamente com nutrientes essenciais e de moléculas importantes, ele pode transportar substâncias ambientalmente tóxicas tais como o Hg, as quais a mãe foi exposta (VIEIRA et al., 2013).

A meia vida do Hg em mulheres é de aproximadamente 75 dias, no período de lactação este tempo é reduzido em aproximadamente 42 dias, indicando maior mobilização de Hg em lactantes (GREENWOOD et al., 1978). Durante a lactação, as crianças estão sujeitas à exposição

ao Hg em suas formas orgânica e inorgânica (BJORNBERG et al., 2005; SUNDBERG et al., 1999), ambas espécies mercuriais podem chegar ao recém-nascido após a passagem da glândula mamária, inserindo ao colostro e ao leite materno (AL-SALEH et al., 2013; VIEIRA, et al, 2013).

Os níveis de Hg no leite materno estão relacionados com variáveis sócio-demográficas, estilo de vida e dieta materna (CHIEN et al., 2006; CUNHA et al., 2013; KOZIKOWSKA & BINKOWSKI et al., 2013). Ou seja, quanto mais exposta a lactante estiver, maior será a exposição do filho. Contudo, por ainda estarem em desenvolvimento neurológico e possuírem mecanismos de desintoxicação imaturos, crianças são potencialmente mais suscetíveis aos efeitos do Hg quando comparadas aos adultos (AL-SALEH et al., 2013; MOLINA-VILLALBA et al., 2015).

Ao avaliar os riscos da exposição ao Hg pelo consumo de leite humano é importante estimar os níveis de ingestão de Hg pelo bebê, para tanto, é necessário ter conhecimento da concentração da substância no leite, do consumo do leite pelo bebê e de seu peso corpóreo, sendo a ingestão calculada de acordo com a **Equação 1** (JARDIM & CALDAS, 2009).

$$Ingest\tilde{a}o = \frac{Hg\ total\ x\ Consumo\ de\ leite\ humana}{Peso\ corp\acute{o}reo} \quad (1)$$

Em 1972 a JECFA (*FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives*), baseada na relação entre a ingestão de Hg a partir de peixe e níveis de Hg no sangue e cabelo associados aos seus efeitos tóxicos, estabeleceu o limite máximo de ingestão semanal provisório (*Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) de 5 µg/kg/pc de HgT e 3,3 µg/kg/pc de metilmercúrio (FAO / WHO, 1972). Contudo, em 2003, baseados em estudos conduzidos nas ilhas Seicheles e Faroé o PTWI foi revisado e substituído, sendo estabelecido o limite de 3,3 µg/kg/pc de MeHg para a população geral e 1,6 µg/kg/pc para mulheres grávidas, além de 5 µg/kg/pc para HgT (FAO/WHO, 2004). Mais recentemente o limite para Hg inorgânico foi substituído para 4 µg/kg/pc, considerando a exposição por meio de consumo de alimentos em geral, com exceção de peixes (FAO/WHO, 2011).

Comparando a ingestão calculada com o limite máximo de ingestão semanal (PTWI = 5 µg/kg pc de HgT) determinado pela OMS, é possível avaliar o risco que a exposição ao Hg pelo

consumo de leite humano oferece ao bebê, o qual pode ser expresso em %, (**Equação 2**) sendo preocupante quando ultrapassar 100% (JARDIM & CALDAS, 2009).

$$PTWI\% = \frac{Ingest\tilde{a}o}{PTWI} \quad (2)$$

Da Costa e colaboradores (2005), em estudo realizado com lactantes residentes em Brasília, estimaram esta exposição considerando como peso médio dos bebês 4 kg e volume médio consumido de 150 g de leite humano/kg de peso corpóreo. Os resultados mostraram que 56,6% dos bebês ingeriram mais Hg que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Ainda em Brasília, Cunha et al. (2012), mostraram que nos primeiros 3 meses de lactação a ingestão de Hg pela amamentação pode exceder o nível de exposição toxicologicamente seguro (PTWI).

2.2.2. Biomonitoramento do mercúrio

Frente à poluição e à degradação ambiental decorrente do atual processo de modernização, a população está exposta a diversos agentes tóxicos, como o Hg. Este cenário exige a prevenção de alterações nos ecossistemas bem como de riscos à saúde humana por meio de estratégias de trabalhos de cunho multidisciplinar (AMORIM, 2003). Apesar do monitoramento ambiental permitir a determinação destes agentes no solo, água, ar, etc., sua presença nestas matrizes não implica, necessariamente, em efeitos adversos a saúde humana (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009).

Assim, o biomonitoramento trata-se de uma estratégia que possibilita a detecção precoce de uma exposição aos agentes tóxicos, podendo diminuir significativamente efeitos adversos à saúde humana. Para tanto, faz-se necessária determinação destes agentes no indivíduo, bem como a definição de níveis permissíveis de exposição e, comparando com estes limites, a avaliação dos possíveis riscos à saúde associados a essa exposição (AMORIM, 2003).

Segundo Esteban & Castaño (2009), o biomonitoramento pode ser definido como a medida direta da exposição de pessoas a contaminantes ambientais. Para tanto, são utilizadas matrizes como osso, tecido adiposo, sangue, cabelo, urina, leite materno, entre outros, as quais podem armazenar ou excretar estas substâncias.

Dentre estas matrizes, o sangue é uma das mais utilizadas, por estar em contato com todos os órgãos e tecidos onde os contaminantes são depositados. Contudo, trata-se de uma matriz muito invasiva, o que, por vezes, inibe a participação de voluntários em estudos epidemiológicos (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009). Vários estudos, em diversas regiões, utilizaram sangue como matriz na avaliação da exposição ao Hg, seja ela ocupacional ou ambiental (BASU et al., 2014; BIRCH et al., 2014; JANICKA et al., 2015; KALISH et al., 2014; MORTENSEN et al., 2014) .

Amostras de cabelo também têm sido amplamente utilizadas em diversos estudos visando a avaliação de exposição crônica a baixas doses de Hg por via alimentar no meio ambiente natural (DÓREA et al., 2005; PINHEIRO et al., 2007; ROCHA et al., 2014), tendo em vista que mais de 80% do HgT no cabelo é MeHg, o que o torna um excelente indicador de exposição a esta espécie mercurial (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009). Além disso, o cabelo apresenta diversas vantagens metodológicas, como, por exemplo, o fato de ser possível estabelecer um histórico da exposição ao longo do tempo e por se tratar de um método não-invasivo, portanto mais aceito pelos participantes (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009; PASSOS & MERGLER, 2008). Essa vantagem metodológica é particularmente interessante em tipos de estudo de avaliação de exposição onde necessita de participantes voluntários (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009).

Rocha et al. (2014) avaliou as concentrações de Hg no cabelo e sangue de crianças de duas comunidades próximas à cidade de Porto Velho, em Rondônia. Neste estudo as concentrações de Hg no cabelo foram proporcionais às encontradas no sangue, sugerindo que, uma vez incorporado no cabelo, o nível de Hg não é modificado e reflete uma exposição contínua ao metal. A Organização Mundial da Saúde preconiza limites biológicos de tolerância para pessoas expostas, sendo no cabelo até $14 \mu\text{g g}^{-1}$ e no sangue até $56 \mu\text{g L}^{-1}$ (FAO/WHO, 2004).

Pirard e colaboradores (2014), avaliaram a concentração de Hg, em 129 crianças (6-11 anos) e suas mães (≤ 45 anos) residentes em áreas urbanas ou rurais da Bélgica, utilizando cabelo como matriz. Observaram que havia correlação significativa entre as concentrações de Hg nas mães e crianças, e que mães e crianças com consumo regular de peixe ou frutos do mar apresentaram maior concentração de Hg (1,7 vezes mais), que aquelas sem consumo regular.

Passos & Mergler (2008) apresentaram uma ampla revisão da literatura científica brasileira e internacional, com vistas a avaliar os níveis de exposição ao Hg em diversos países amazônicos. Uma das tabelas apresentadas no artigo, e reproduzida na **Tabela 1**, relata de maneira sumária grande quantidade de dados sobre os teores de Hg em cabelos de diversas

comunidades consumidoras de peixe, dentre as quais as populações ribeirinhas encontram-se dentre as mais expostas, com médias de Hg no cabelo tão altas quanto 38 e 65 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 1 – Resumo das concentrações de Hg em cabelo, relatados para comunidades consumidoras de peixe na Bacia Amazônica, com a localização, característica da população estudada, faixa de idade, número amostral e referência.

Localização	População	Idade	N	HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$)		% MeHg	Referência
				Média±SD	Variação	Variação	
Rio Madeira	Ribeirinha	-	713	15,2±9,6	6 – 150	-	Bastos et al. (2006)
Rio Tapajós	Ribeirinha	< 15 a 65	69	15±NA	-	-	Pinheiro et al. (2006)
Rio Madeira	Ribeirinha	-	241	17,2±NA	NA - 303	-	Boischio & Barbosa (1993)
Parque Xingu	Indígena	-	27	18,5±NA	6,9 – 34	-	Vaconcelos et al. (1994)
Lago Cuniã	Ribeirinha	-	75	8,7±NA	NA – 31,9	70 – 80	Barbosa et al. (1995)
Rio Fresco	Indígena	-	419	8,0±NA	-	-	Barbosa et al. (1995)
Rio Tapajós	Ribeirinha	-	101	21±NA	4,7 – 151	85 – 91	Malm et al. (1995)
Rio Negro	Ribeirinha	-	101	38,6±14,4	-	-	Eve et al. (1996)
Rio Teles Pires e Juruena	Indígena	-	55	34,2±NA	10 a > 50	87,2	Barbosa et al. (1997)
Yanomami	Indígena	-	14	3,3±1,2	1,5 - 6,0	58 – 97	Kehrig et al. (1997)
Rio Tapajós e Madeira	Ribeirinha	-	82	16,7±7,3	1,0 – 59,4	8,7 – 100	Kehrig et al. (1997)
Rio Tapajós	Ribeirinha	≥ 15	96	12,9 [#]	0 – 145	73 – 94	Lebel et al. (1997)
Rio Madeira	Ribeirinha	0,1 – 32	28	-	4,0 – 84,4	84 – 90	Barbosa et al. (1998)
Lago Pracuúba	Ribeirinha	-	15	16,7±NA	-	-	Guimarães et al. (1999)
Cidade de Alta Floresta	Urbana	14 - 45	75	1,1±1,17	0,1 – 8,2	-	Hacon et al. (2000)
Rio Tapajós	Ribeirinha	-	-	17±8,5	2,9 – 71,5	-	Pinheiro et al. (2000)
Parque Xingu	Indígena	-	-	13,6±4,7	4,3 – 32,8	-	Vasconcelos et al. (2000)
Rio Negro	Ribeirinha	<15 a 40	76	21,4±12,7	1,7 – 59	34 – 100	Barbosa et al. (2001)
Rio Tapajós	Ribeirinha	12 - 68	36	12,5 [#]	2,9 – 27	-	Dolbec et al. (2001)
Município de Rio Branco	Urbana	0 a > 60	2,32	2,4±3,9	0,8 – 72,7	-	Santos et al. (2002)
Rio Fresco	Indígena	< 2 a 45	28	8,1±3,2	0,8 – 13,7	-	Barbosa et al. (1998)
Rio Tapajós	Ribeirinha	< 1	-	12±NA	9,6 – 14,6	-	Boischio et al. (2003)
Município de Santarém	Urbana	17 - 25	44	2,0±1,8	0,08 – 15,2	-	Passos et al. (2003)
Reserva Pakaanóva	Indígena	0,5 – 90	910	8,4±6,4	0,5 – 83,9	-	Santos et al. (2003)
Rio Tapajós	Indígena	< 10	203	8,1±5,2	-	-	Dórea et al. (2005)
Rio Negro	Urbana	-	399	11,4±NA	0,1 – 83,1	-	Santos et al. (2005)
Rio Tapajós e Tocantins	Ribeirinha	0,1 – 12	168	5,1	0,4 – 53,8	-	Pinheiro et al. (2007)
Rio Beni	Indígena	-	80	9,8±NA	4,3 – 19,5	-	Maurice-Bourgoin et al. 2000)

Fonte: Passos & Mergler (2008) – Adaptado

Enquanto o cabelo é comumente utilizado na avaliação de exposição crônica, concentrações de Hg na urina refletem uma exposição mais recente, característica de exposição ocupacional, sendo muito utilizada na avaliação da exposição ao vapor de mercúrio metálico e formas inorgânicas de Hg (MOLINA-VILLALBA et al., 2015). Straaten (2000) investigou a exposição de garimpeiros na região do norte da Tanzânia por meio da análise de Hg em urina, onde 12, dos 45 garimpeiros voluntários, apresentaram concentrações urinárias de Hg entre 50 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatina e 4 apresentaram concentrações superiores a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatina, sendo essas concentrações muito superiores as encontradas no grupo controle, demonstrando claramente os riscos de exposição ocupacional de pessoas que trabalham com Hg.

Molina-Villalba e colaboradores (2015) avaliaram a exposição ao Hg e outros metais traço na urina e cabelo de 261 crianças, de 6 a 9 anos, que viviam próximas de áreas industriais e/ou de mineração em Huelva, sudoeste Espanha, e os municípios circunvizinhos. Neste estudo foi encontrando na urina $1,31 \pm 1,23 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg e $1,282 \pm 1,524 \mu\text{g g}^{-1}$ no cabelo, onde se observou correlação significativa entre as concentrações na urina e no cabelo.

Outra matriz muito utilizada no biomonitoramento é o leite materno. Devido a seu alto teor de gordura é comumente utilizado no monitoramento de substâncias lipofílicas, além de fornecer informações quanto aos níveis de exposição tanto da mãe quanto do filho. Quando utilizado como matriz, faz-se importante considerar o tempo de lactação, tendo em vista a redução de produtos químicos resultante do processo de depuração (SAKAMOTO et al., 2015). Diversos trabalhos têm utilizado essa matriz na avaliação da exposição ao Hg, a **Tabela 2** apresenta, de maneira sumária e cronológica alguns destes estudos.

Tabela 2 – Resumo das concentrações de HgT em leite humano, de acordo com literatura científica especializada, publicadas no período de 1998 a 2013, com a localização, número amostral, período de lactação e referência.

Localização	Número amostral	Período de amamentação	HgT (PPB)		Referência
			Média \pm DP	Varição	
Comunidades ribeirinhas do Rio Madeira, Rondônia, Brasil	46	2 a 60 semanas	-	0,12 – 6,48	Vieira et al. (2013)
Porto Velho, Rondônia, Brasil	45	2 a 60 semanas	-	0,09 – 3,74	Vieira et al. (2013)
Centro-Oeste do Brasil	142 (32 voluntárias)	2 a 13 semanas	$6,47 \pm 6,04$	$<0,76 - 2,27$	Cunha et al. 2013
Arábia Saudita	155	-	$1,19 \pm 0,76$	0,012-6,44	Al-Saleh et al. (2013)

Tabela 2 – Resumo das concentrações de HgT em leite humano, de acordo com literatura científica especializada, publicadas no período de 1998 a 2013, com a localização, número amostral, período de lactação e referência – Continuação.

Localização	Número amostral	Período de amamentação	HgT (PPB)		Referência
			Média ± DP	Variação	
Ancara, Turquia	26	4 a 8 semanas	25,8 ± 44,6	1,8-236	Örün et al. (2012)
Isfahan, Iran	37	-	0,92 ± 0,54	0,0 – 2,07	Goudarzi et al. (2012)
Tehran, Iran	34	-	0,12 ± 0,06	<0,01 – 1,73	Behrooz et al. (2012)
Tabriz, Iran	28	-	0,86 ± 0,26	0,02 – 5,86	Behrooz et al. (2012)
Noushahr, Iran	18	-	0,15 ± 0,06	<0,01 – 1,21	Behrooz et al. (2012)
Ancara, Turquia	21	2 a 3 semanas	3,42 ± 1,66	0,35 – 6,90	Yalçın et al. (2010)
Kalimantan and Sulawesi, Indonésia; Geita, Tanzânia; e Kadoma, Zimbábue	46	1 a 6 semanas	-	<1,0 – 149,60	Bose-O'Reilly et al. (2008)
Taipei, Taiwan	68	1ª semana	2,03 ± 2,48	0,24 – 9,45	Chien et al. (2006)
Brasília, Distrito Federal, Brasil	26	-	5,73 ± 4,46	0,0 – 23,07	Da Costa et al. (2005)
Huddinge, Suécia	15	1ª semana	-	0,06 – 2,01	Björnberg et al. (2005)
Huddinge, Suécia	15	6 semanas	-	0,07 – 0,37	Björnberg et al. (2005)
Bavaria, Alemanha	116	1ª semana	1,37 ± 2,14	<0,25 – 20,3	Drexler e Schaller (1998)
Bavaria, Alemanha	84	8 semanas	0,64 ± 1,46	<0,25 – 11,7	Drexler e Schaller (1998)
Munique, Alemanha	70 (46 voluntárias)	1ª semana	-	<0,2 – 6,86	Drash et al. (1998)
Comunidades Ribeirinhas do Rio Madeira, Rondônia, Brasil	47	2 a 60 semanas	5,8 ± 5,9	0,0 – 24,8	Barbosa e Dórea (1998)

Em suma, várias são as matrizes disponíveis para avaliar a exposição humana ao Hg e aos diversos tipos de metais tóxicos, contudo, ao se iniciar um estudo é importante tomar como base algumas características principais para a escolha de uma matriz ideal, como não representar riscos a saúde do doador, ser disponível em quantidade suficiente para análise, conter níveis detectáveis do contaminante, além de refletir a carga corporal do doador (ESTEBAN & CASTAÑO, 2009).

2.2.2.1. Biomarcadores

Considerados “sistemas de alerta” no biomonitoramento, os biomarcadores são toda substância, seu produto de biotransformação ou qualquer alteração bioquímica precoce, que por

meio de sua determinação seja possível estabelecer relação entre a exposição e o efeito tóxico de um poluente em um organismo, refletida em alterações fisiológicas e/ou a suscetibilidade dos indivíduos (AMORIM, 2003).

Existem três tipos de biomarcadores, de exposição, de efeito e de suscetibilidade, os quais podem ser aplicados para várias finalidades, a depender do intuito do estudo e do tipo de exposição a ser analisada (AMORIM, 2003; JIMÉNEZ, et al., 2009; JUÁRES et al., 2009). Segundo Juárez e colaboradores (2010), um bom biomarcador deve reunir 5 características principais: ser eticamente aceitável, ser identificado facilmente em uma matriz biológica, refletir uma condição subclínica reversível, ter especificidade e possibilitar medidas preventivas.

Assim, biomarcadores têm um papel importante em avaliações de risco, pois permitem relacionar o estado fisiológico de um organismo com parâmetro no nível populacional previamente, além de possibilitar economia financeira, de tempo, e de profissionais. Ao evidenciar os efeitos e suas causas, os biomarcadores podem ser úteis tanto na ciência como no desenvolvimento de políticas públicas referentes à saúde ambiental. Dessa forma, diversos estudos têm buscado em novas técnicas formas de identificar possíveis biomarcadores de metais tóxicos, como a metalômica (MORAES et al., 2012).

2.3. METALÔMICA

Estudos relacionados ao genoma e ao proteoma têm gerado grande desenvolvimento em diversas áreas de pesquisa (GARCIA et al., 2006). O genoma refere-se a todos os genes de um organismo (LANÇAS et al., 2003). Já o proteoma trata-se do conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma. Enquanto o primeiro fornece apenas informações estatísticas, o proteoma possibilita uma visão mais abrangente do aparelho celular assim como de seus processos. Isso porque as proteínas são capazes de interagir de inúmeras formas entre si, além de responderem às mudanças ambientais e ao desenvolvimento do organismo, o que o torna mais complexo em comparação ao genoma (BENDIXEN et al., 2005; LANÇAS et al., 2003; MANSO et al., 2005; POMASTOWSKI et al., 2014; ROTILIO et al., 2012).

A análise do proteoma, denominada proteômica, busca compreender a função de cada gene no organismo vivo (STULTS et al., 2005). Fazendo-se necessário não só enumerar a sequência de aminoácidos que formam a proteína, mas também sua estrutura tridimensional e função (LANÇAS et al., 2003). Em estudos proteômicos, ao invés de provar ou refutar uma

determinada hipótese, busca-se gerar grande número de dados, os quais podem ser consultados a fim de definir padrões de informações que possam ser inferidas (STULTS et al., 2005).

Além de sustentar todos os aspectos das atividades biológicas em um organismo (WHITFORD, 2005; POMASTOWSKI et al., 2014), as proteínas são responsáveis por inúmeras doenças, as quais são decorrentes de defeitos em proteínas específicas (BERG et al., 2004), o que torna estudos proteômicos fundamentais em vários campos de pesquisa. Por meio destes é possível conhecer o interior das proteínas, ou seja, definir um sistema biológico completo e, possivelmente, aperfeiçoar métodos de diagnósticos e prevenção de doenças (STULTS et al., 2005; POMASTOWSKI et al., 2014; ZAIA et al., 1998).

Avanços tecnológicos nessas áreas têm possibilitado o desenvolvimento de novos campos de pesquisa, como a metalômica. Que por sua vez, busca a caracterização funcional e estrutural, em escala genômica, de proteínas ligadas a metais (SHI e CHANCE, 2008), tendo em vista que metais são elementos integrantes de grande parte dos processos biológicos em organismos vivos, alguns tóxicos em níveis elevados e essenciais em pequenas quantidades, outros tolerados em níveis excessivamente elevados ou simplesmente tóxicos (YANNONE et al., 2012).

Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas necessitam de íons metálicos para suas atividades biológicas (GARCIA et al., 2006; LIMA et al., 2010), sendo que 12 dos 23 elementos conhecidos com funções biológica são metais (FARINA et al., 2013). Exemplo disso são a albumina e a lactoferrina presentes no leite, a primeira contribui na biodisponibilidade de zinco e a outra auxilia no combate a patógenos quando ligada ao ferro (POZZI et al., 2015). Embora haja essencialidade de alguns íons metálicos, existem aqueles que não possuem qualquer função biológica conhecida, os quais podem causar diversos efeitos deletérios aos seres humanos, como o Hg, metal tóxico que afeta principalmente o sistema nervoso central e sistemas renais (PEIXOTO et al., 2014). O que torna estudos metalômicos indispensáveis para a compreensão do impacto, função e ou toxicidade de íons metálicos em sistemas biológicos (GARCIA et al., 2006; YANNONE et al., 2012).

Estudos nestas áreas têm gerado grande impacto na ciência, possibilitando, por exemplo, a obtenção de biomarcadores, altamente específicos e úteis, de doenças como doença de Parkinson (LICKER et al., 2014), sarcomas (KONDO et al., 2014), distúrbios neuropsiquiátricos (PATEL et al., 2014), dentre outras. Estes biomarcadores poderão ser utilizados em ensaios buscando obter

maior conhecimento a respeito de doenças assim como seu diagnóstico e tratamento (BREWIS et al., 2010; HAENEN et al., 2014; POMASTOWSKI et al., 2014; STULTS et al., 2005).

2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Estudos metalômicos combinam técnicas proteômicas, como eletroforese, cromatografia e bioinformática, a técnicas quantitativas, como espectrometria de absorção. Embora tenham surgido vantagens e avanços na tecnologia e metodologia nestas áreas científicas, ainda existem muitos desafios para que se atinja a excelência. Neste sentido, o preparo das amostras trata-se de um ponto crucial para que as análises apresentem resultados satisfatórios, fazendo-se necessária otimização de um método, de modo a garantir boa resolução na separação proteica (LICKER et al., 2014; STULTS et al., 2005).

Neste tipo de análise é indispensável a extração e separação das proteínas, sendo o processo de extração determinado em função das características de cada tipo de amostra (BRACHT et al., 2003, LICKER et al., 2014). Assim, inicialmente as células do material biológico estudado devem ser rompidas, por meio de métodos físicos (ex.: maceração ou centrifugação) ou químicos (ex.: enzimático ou na presença de detergentes) (FLACK et al., 1984).

Devido as suas características hidrofóbicas (não solúveis em água), as proteínas encontram-se ligadas a membranas ou partículas, ou agregadas e para sua completa extração é necessária a redução dessas interações hidrofóbicas. Então, logo após o rompimento celular, para que ocorra o completo rompimento das interações intra e intermoleculares, as proteínas precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas (BRACHT et al., 2003; LICKER et al., 2014). Estas etapas de preparo da amostra são conduzidas em um tampão composto por surfactantes, agentes redutores, além de inibidores de protease (POMASTOWSKI et al., 2014).

O efetivo fracionamento de proteínas pode ser feito por diversos métodos, os quais buscam separá-las de outras substâncias a partir de suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, carga elétrica e massa molecular (BRACHT et al., 2003). Além dos métodos cromatográficos, amplamente utilizados no fracionamento de moléculas, a eletroforese é um ótimo método analítico, pois permite a visualização das proteínas separadas, possibilitando a estimativa do número de proteínas assim como seu peso molecular estimado e ponto isoeletrico

(BRACHT et al., 2003; NELSON, 2002). Após a separação das proteínas, as bandas ou *spots* proteicos são submetidos à caracterização utilizando a técnica de espectrometria de massas.

O termo eletroforese refere-se à migração de proteínas carregadas em um campo elétrico (DUNBAR, 1987, GARCIA et al., 2006; NELSON, 2002; WRIGHT et al., 2012). Nesta técnica, moléculas ionizadas migram em uma mesma direção, repelindo-se e mantendo intactas suas estruturas e propriedades, dessa forma é possível separá-las em várias frações (bandas ou *spots*) (PETERS et al., 2012).

Essa técnica é utilizada desde o final da década de 30. Entretanto, sua resolução só se tornou satisfatória às necessidades analíticas da química moderna após a inserção de suportes que retardam ou excluem moléculas em função de suas massas moleculares, tais como a poli(acrilamida), a qual foi introduzida como suporte no final da década de 50 (BRACHT et al., 2003). A vantagem da utilização do gel de poli(acrilamida) está no fato de se tratar de um material transparente, quimicamente inerte e estável a uma ampla variação de temperatura, pH e força iônica (KIM et al., 2005)

Este gel apresenta ligações cruzadas que atuam como uma “peneira molecular”, possibilitando a migração das proteínas na proporção aproximada da razão carga/massa de proteína (NELSON, 2002). É composto por acrilamida e N, N-metileno-bis acrilamida (bis-acrilamida) copolimerizadas (GARCIA et al., 2006; KIM et al., 2005). A polimerização vinílica é catalisada por persulfato de amônio, que dissolvido em H₂O forma radicais livres, os quais são estabilizados pela adição de Tetrametilenodiamina (TEMED). Estes radicais livres ativam a acrilamida, que por sua vez, reage com outras moléculas de acrilamida formando uma longa cadeia linear do polímero. A bis-acrilamida forma as ligações cruzadas entre essas cadeias formando uma espécie de “malha” por onde ocorre a migração das proteínas (BRACHT et al., 2003; DUNBAR, 1987).

As propriedades físico-químicas do gel, tais como a elasticidade, densidade e tamanho dos poros presentes na malha, são determinados pela sua relação acrilamida/bis-acrilamida, a qual influencia diretamente na resolução da separação das proteínas na eletroforese (DUNBAR, 1987; GARCIA et al., 2006).

O fracionamento das proteínas em métodos eletroforéticos é feito com base na heterogeneidade de algumas propriedades físico-químicas das proteínas, tais como carga elétrica líquida, massa molecular e ponto isoelétrico (BRACHT et al., 2003)

A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) trata-se de uma técnica eletroforética amplamente aplicada em estudos, por permitir, dentre outros, a estimativa da massa molecular relativa de proteínas, a determinação de proteínas glicosadas e análise de proteínas utilizando mapeamento de peptídeos (DUNBAR, 1987). Nesta técnica as proteínas são separadas com base em sua massa molecular. Para isso, o SDS liga-se a porções hidrofóbicas das proteínas alterando sua conformação nativa e lhes conferindo uma conformação estendida estável. Neste processo, o SDS forma um complexo de tamanho proporcional à sua massa molecular e adiciona cargas negativas excluindo a interferência das cargas inerentes às proteínas. Dessa forma, a razão entre carga e massa das proteínas torna-se semelhante, possibilitando a migração das proteínas em função das massas dos complexos SDS-proteína (BRACHT et al., 2003; GARCIA et al., 2006; NELSON, 2002).

No SDS-PAGE são utilizados dois géis de diferentes concentrações de acrilamida, o gel de empilhamento (ou empacotamento) e o gel de separação (ou corrida). O gel de empilhamento tem menor concentração de acrilamida (2-5%), e conseqüentemente poros maiores. Sua utilização possibilita melhor resolução da separação de proteínas no gel de corrida (DUNBAR, 1987).

Em condições desnaturantes, ou seja, com a adição de agentes redutores como o DTT, é possível determinar a massa molecular das proteínas. Para tanto, são aplicados no mesmo gel da proteína de interesse, padrões proteicos com massas moleculares conhecidas e após a corrida eletroforética determina-se sua mobilidade relativa (Rf), ou seja, sua migração no gel. Por meio deste resultado é possível montar uma curva de calibração com os logaritmos de suas massas moleculares em função dos dados de Rf e determinar a massa molecular da proteína de interesse (BRACHT et al., 2003).

Para a visualização das proteínas no gel são utilizadas várias técnicas de coloração, como coloração por nitrato de prata, coloração para glicoproteínas, coloração de fluorescência e coloração pelo azul de coomassie (R250/350, G250). Este último é bastante utilizado por se tratar de um método econômico o qual permite além da coloração, a fixação das proteínas no gel (BRACHT et al., 2003, STULTS et al., 2005, WRIGHT et al., 2012). Quando adicionado no gel juntamente à amostra, o corante forma um complexo ao interagir com as cadeias laterais básicas e aromáticas das proteínas. Por meio dessa interação ocorre o deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA et al, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis biomarcadores proteicos de exposição ao Hg em amostra de leite de lactantes residentes em comunidades tradicionais do alto rio Madeira, área de influência da Usina Hidrelétrica Jirau, por meio de estudo metalômico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os principais objetivos específicos compreendem:

- a) Determinar os níveis de exposição humana ao Hg na área de estudo;
- b) Adequar o fracionamento/separação de metaloproteínas em amostras leite de lactantes residentes em comunidades tradicionais do alto rio Madeira;
- c) Identificar as principais bandas com presença de mercúrio, assim como possíveis metaloproteínas biomarcadoras de exposição ao Hg.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, sendo que todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida pelo sistema PURELAB Ultra. Foram utilizados os seguintes reagentes e soluções:

- Ácido acético glacial, $C_2H_4O_2$, MM = 60,05 g/mol (J.T. Baker);
- Ácido clorídrico, HCl, MM = 36,46 g/mol (J.T. Baker);
- Ácido nítrico, HNO_3 , MM = 63,01 g/mol (Merck);
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 95-98% (J.T. Baker);
- Acrilamida, C_3H_5NO , MM = 71,08 g/mol (GE Healthcare, Life Sciences);
- Albumina de soro bovino (Merck);
- Azul de bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, MM = 691,94 g/mol (BioAgency);
- Coomassie blue R-250, PhastGel Blue R, $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$, MM = 825,97 g/mol (GE healthcare Bio-Sciences);
- Ditioneitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, MM = 154,24 g/mol (Amersham Biosciences);
- Dodecilsulfato de sódio (SDS), $C_{12}H_{25}OSO_3Na$, MM = 288,38 g/mol (GE Healthcare Life Sciences);

- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, MM = 92,09 g/mol (Amersham Biosciences);
- Metanol, CH_4O , MM = 32,04 g/mol (J.T. Baker);
- Nitrato de paládio, $Pd(NO_3)_2$, (Merck);
- Nitrato de zircônio, $ZrO(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$, (Merck);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, MM = 154,17 g/mol (GE Healthcare Life Sciences);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, MM = 116,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences);
- Padrão proteico de massa molar (GE Healthcare Life Sciences);
- Peróxido de hidrogênio 30%, H_2O_2 (Merck KGaA);
- Persulfato de amônio, $N_2H_8S_2O_8$, MM = 228,20 g/mol (GE Healthcare Life Sciences);
- Solução padrão de mercúrio 1.000 mg L⁻¹ (Merck);
- Terra diatomácea (Teledyne Technologies Company);
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, MM = 121,14 g/mol (GE Healthcare Life Sciences).

4.2. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios utilizados foram descontaminados por meio de imersão em ácido nítrico 10% (v/v) por 12h. Após este procedimento o material foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. Sendo que para realização das análises laboratoriais foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Agitador por efeito Vórtex, modelo AC-110V (Vivax);
- Agitador magnético, modelo PC-420 (Corning);
- Amostrador automático, modelo ASC-6100;
- Analisador automático para a determinação direta de mercúrio por decomposição térmica e amalgamação em colunas de areia de ouro, SMS 100 (Perkin Elmer);
- Aparato para filtração com disco de filtro de membrana 0,45 µm;
- Balança analítica, modelo BG – 400 (GEHAKA);
- Banho Maria, modelo USC-18000A (UNIQUE);
- Bloco digestor;

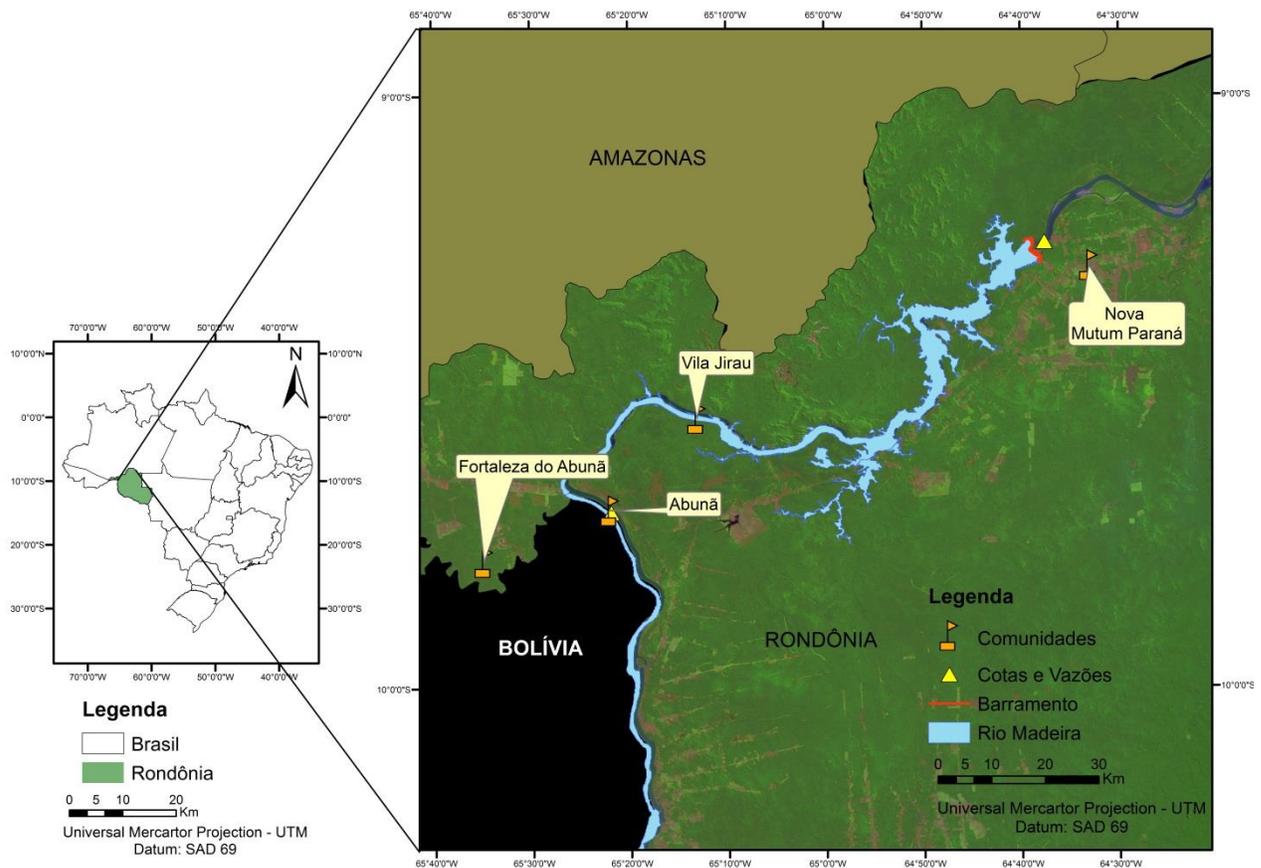
- Bomba a vácuo;
- Cuba para eletroforese do tipo SDS-PAGE, Hoefer miniVE₇ (GE Healthcare Life Sciences);
- Espectrofotômetro UV/Visível, modelo Genesys 6 (ThermoSpectronic);
- Espectrômetro de absorção atômica, modelo AA 6800 (SHIMADZU);
- Estufa de circulação forçada;
- Mesa agitadora, modelo TE-140 (Tecnal);
- Scanner para gel ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences);
- Sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite, modelo GFA-EX7;
- Sistema de purificação PURELAB Ultra, (ELGA LabWater);
- Sistema para SDS-PAGE, modelo Hoefer miniVE (Amersham Biosciences);
- Ultracentrífuga refrigerada, modelo Universal 320R (Hettich);
- Vidrarias convencionalmente utilizada em um laboratório de química analítica e eletroforese e copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica.

4.3. ÁREA DE ESTUDO

Este estudo se insere no âmbito de um Programa de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Setor de Energia Elétrica, denominado “*Biomarcadores de toxicidade do mercúrio aplicados ao setor hidrelétrico na região Amazônica*”. As comunidades estudadas são aquelas que vivem na região do alto rio Madeira, compreendendo as comunidades de Fortaleza do Abunã, Abunã, Nova Mutum Paraná e Vila Jirau, conforme apresentado na **Figura 3**.

Representando cerca de 23% da Bacia Amazônica, o rio Madeira é um dos principais afluentes do rio Amazonas, com área de aproximadamente 1,47 milhões de km² e 3.400 km de extensão, dos quais, cerca de 1.500 km estão em território brasileiro. Nasce nos Andes Bolivianos, como rio Mamoré (BASTOS et al., 2007; 2008; GALVÃO et al, 2008) tem suas cabeceiras ainda no Escudo Brasileiro, o qual é desnudado e antigo, e nas terras baixas do Terciário cobertas por florestas. Por fluir em diferentes relevos, litologias, climas e vegetações, o rio Madeira possui diferentes características hidrológicas e hidroquímicas.

Figura 3 – Mapeamento das localidades onde foram feitas as amostragens.



Classificado como um rio de águas brancas amareladas, ricas em sólidos suspensos (GALVÃO et al., 2008), contribui com cerca de 50% da carga total de material suspenso transportado pelo rio Amazonas (BASTOS et al., 2007). Em função da grande carga de materiais suspensos e sedimento que transporta, é classificado como um veículo de transporte e dispersão de poluentes orgânicos e inorgânicos, tais como metais (GALVÃO et al., 2008).

Na década de 1970 o rio Madeira se tornou a segunda mais importante região produtora de ouro da Amazônia. Esta atividade teve seu auge durante a década de 1980, quando houve a liberação da Reserva Garimpeira do rio Madeira, causando diversos impactos ambientais, como o aporte de grandes quantidades de Hg gasoso na atmosfera. Estima-se que entre 1979 e 1990, cerca de 87 toneladas de Hg foram emitidas no ambiente (BASTOS & LACERDA, 2004). Atualmente, segundo o Estudo de Impacto Ambiental das Hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau, 80% das famílias entrevistadas para o estudo, possuem algum membro em atividades ligadas ao garimpo (EIA/RIMA, 2005).

Ainda sobre as atividades econômicas da região, as principais fontes de renda são o trabalho assalariado ou autônomo, o garimpo, trabalho nas madeireiras e um conjunto diversificado de ocupações tipicamente urbanas. A agricultura e atividades mistas, principalmente para subsistência, são os principais usos da terra. A pesca também tem grande representatividade, de caráter estritamente artesanal, é de grande importância como fonte de renda para população. A princípio essa atividade era meramente complementar, contudo, em meados do século XX, a pesca tornou-se uma atividade profissional permanente (EIA/RIMA, 2005).

4.4. COLETA DE AMOSTRA

Antes de qualquer coleta, as nove voluntárias que concordaram em participar deste estudo (**Tabela 3**) foram submetidas a uma breve entrevista para certificação do aceite da coleta de amostra biológica (cabelo e leite materno), sendo que todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderem a questionários sócio-histórico e alimentar (**Apêndices A e B**). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UnB (**Anexo A**).

Tabela 3 – Localização das comunidades, identificação e tempo de lactação de cada lactante no momento da coleta.

Comunidades	Lactante	Tempo de Lactação
Abunã	1	70 dias
Abunã	2	32 dias
Abunã	3	51 dias
Vila Jirau	4	30 dias
Abunã	5	59 dias
Fortaleza do Abunã	6	30 dias
Fortaleza do Abunã	7	70 dias
Nova Mutum Paraná	8	20 dias
Vila Jirau	9	20 dias

4.4.1. Coleta de cabelo

Amostras de cabelo foram coletadas para a avaliação dos níveis de exposição ambiental por via alimentar ao mercúrio. As amostras de cabelos (aproximadamente 5 g) foram coletadas da região da nuca, com tesoura de aço e por pessoal previamente treinado (**Figura 4**). Em seguida as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas à temperatura ambiente em local limpo e seco até o momento da análise.

Figura 4 – Coleta de amostras de cabelo.



4.4.2. Coleta de leite materno

As amostras de leite materno (aproximadamente 100 mL) foram coletadas pelas próprias lactantes, por ordenha manual, em frascos de vidro esterilizados (**Figura 5**). Após a coleta as amostras foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Bioanalítica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu-SP, onde foram mantidas a -25°C até o momento das análises.

Figura 5 – Coleta de amostras de leite materno.



4.5. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL

4.5.1. Preparo de Amostras

4.5.1.1. Preparo das Amostras de Cabelo

Para determinação de HgT em amostras de cabelo, as mesmas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 mm, com o auxílio de uma tesoura e em local limpo. Posteriormente, foram transferidas para um béquer onde foi adicionada acetona na quantidade aproximada do

dobro do volume da amostra. Após decantação da amostra, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionada água deionizada, aproximada do dobro do volume da amostra, esperou-se novamente a amostra decantar e descartou-se o sobrenadante. O procedimento com água foi repetido por 2 vezes e acetona foi adicionada novamente. Após decantação da amostra, o sobrenadante foi desprezado e com o auxílio de “jatos” de acetona, transferiu-se a amostra de cabelo para o papel filtro e aguardou-se até completa filtração. Após secagem a temperatura ambiente, a amostra foi armazenada em recipiente de vidro descontaminado até o momento da análise.

4.5.1.2. Mineralização das Amostras de Leite Materno

As amostras de leite foram descongeladas a temperatura ambiente e posteriormente 500 μL de amostra foram transferidos para um tubo de ensaio de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução de ácido nítrico concentrado (HNO_3) e mantido sob aquecimento por cerca de 1 hora a 60°C até que a amostra estivesse completamente digerida. Finalmente o volume foi ajustado em balão volumétrico de 5 mL com água ultrapura.

4.5.1.3. Mineralização das Bandas Proteicas

As bandas proteicas obtidas por eletroforese foram mineralizadas para determinação de HgT. Nesta etapa, 3 bandas de mesma massa molar obtidas em 3 separações eletroforética simultaneamente foram recortadas e adicionadas a um tubo de ensaio de 5 mL. Posteriormente foi adicionado 1 mL de solução de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e mantido sob aquecimento por cerca de 3 min a 60°C . A mistura foi resfriada a temperatura ambiente e adicionados 500 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% (v/v), sendo retornada ao aquecimento a 60°C até que as bandas estivessem completamente digeridas. Finalmente o volume foi ajustado em balão volumétrico de 5 mL com água ultrapura.

4.5.2. Determinação de mercúrio total em cabelo

A quantificação direta de HgT nas amostras de cabelo utilizou a técnica de espectrometria de absorção atômica dedicada a determinação de mercúrio. Para tanto, as amostra de cabelo preparadas foram transferidas para barquinhas de níquel e alocadas no amostrador automático do equipamento de análise direta de mercúrio SMS 100 / Perking Elmer. A massa de cabelo transferida para barquinhas de níquel depende da concentração de mercúrio na amostra de cabelo

preparada, sendo ajustada a massa da amostra com o compromisso do intervalo da curva analítica de calibração do método analítico.

4.5.2.1. Preparo da Curva de Calibração

Para determinação de HgT em amostras de cabelo, por SMS 100, foi construída curva analítica no intervalo de concentração 10 – 300 ng. Para o preparo desta curva utilizou-se soluções padrão de 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ de mercúrio, obtidas por diluição de solução padrão de 100 mg L⁻¹. Na obtenção dos padrões de mercúrio, alíquotas da solução padrão estoque de 0,1 ou 1,0 mg L⁻¹ de mercúrio foram transferidas para barquinhas de níquel contendo terra diatomácea, conforme apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Volume das soluções intermediárias de Hg de 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ utilizado no preparo da curva analítica para os intervalos alto e baixo; e respectivos tempo de secagem.

Ponto	Concentração do Padrão	Volume (µL)	Tempo de Secagem (s)
Branco	Água	100	90
10 ng	0,1 mg L ⁻¹	100	90
15 ng	0,1 mg L ⁻¹	150	135
20 ng	0,1 mg L ⁻¹	200	180
25 ng	0,1 mg L ⁻¹	250	225
30 ng	0,1 mg L ⁻¹	300	270
100 ng	1,0 mg L ⁻¹	100	90
150 ng	1,0 mg L ⁻¹	150	135
200 ng	1,0 mg L ⁻¹	200	180
250 ng	1,0 mg L ⁻¹	250	225
300 ng	1,0 mg L ⁻¹	300	270

4.5.3. Determinação de mercúrio total em leite materno e bandas proteicas

As concentrações de HgT nos extratos ácidos obtidos no processo de mineralização das amostras de leite materno e bandas proteicas foram determinadas utilizando espectrômetro de absorção atômica (SHIMADZU AA-6800) com amostrador automático (ASC-6100) e sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFA-EX7).

Seguiu-se o procedimento descrito por Moraes et. al (2013), onde utilizou-se lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Manteve-se fluxo constante de 1 L min⁻¹ de argônio (gás inerte) durante todo o programa, interrompendo-se seu fluxo apenas na etapa de atomização.

No intuito de prolongar a vida útil dos tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada, utilizados nas determinações de HgT, suas paredes internas foram recobertas com

zircônio. Este procedimento permite também maior estabilização térmica do mercúrio (ORTNER et al., 2002). Dessa forma, alíquotas de 25 μL de solução contendo 1.000 mg L^{-1} do modificador nitrato de zircônio foram injetadas dentro do atomizador, com aquecimento até 500° C. Também foi utilizado como modificador químico em solução 1.000 mg L^{-1} de nitrato de paládio co-injetado com a amostra dentro do atomizador para auxiliar no processo de estabilização térmica do Hg.

Os sinais e absorbância foram medidos em área de pico e em triplicata, injetando-se alíquotas de 20 μL das soluções padrões e/ou amostras mineralizadas juntamente com 4 μL do modificador nitrato de paládio para dentro do tubo de grafite recoberto com carvão de zircônio, utilizando-se micropipeta do autoamostrador. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de HgT nestas amostras está apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Programação de aquecimento do tubo de grafite para determinação de HgT nos extratos ácidos obtidos das mineralizações das amostras de leite in-natura e bandas proteicas.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de argônio (L min^{-1})
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	250	5	5	1
Pirólise	600	5	10	1
Atomização	1600	2	5	0
Limpeza	1800	5	0	1

Fonte: Moraes et al. (2013) – adaptado.

A otimização do método para análise de HgT em leite humano e bandas proteicas, bem como sua validação estão descritos no **Apêndice C** deste trabalho.

4.5.3.1. Preparo da Curva Analítica

Para determinação do HgT por espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), foi construída curva analítica no intervalo de concentração 0,25 – 1,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o preparo desta curva utilizou-se solução padrão de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, obtida por diluição de solução padrão de 1.000 mg L^{-1} . Para a obtenção dos padrões de mercúrio, alíquotas de 2,5, 5, 10 e 15 mL, da solução padrão contendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio foram diluídas para 50 mL em balão volumétrico a fim de se obter o intervalo de concentração da curva analítica.

4.6. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS

4.6.1. Extração de proteínas

As amostras de leite materno das 9 lactantes foram descongeladas a temperatura ambiente e a fração lipídica foi separada da proteica por meio de centrifugação em uma ultracentrífuga refrigerada, a 14.000 rpm por 30 min (LONNERDAL & FORSUM, 1985 – adaptado). Os extratos proteicos obtidos foram utilizados na quantificação da concentração de proteína total e posteriormente, nas corridas eletroforéticas.

4.6.2. Determinação de proteínas totais

Para obter-se o volume exato de extrato proteico a ser aplicado no gel de poliacrilamida faz-se necessário determinar a concentração de proteínas totais presente no extrato. Para tanto, a concentração de proteínas totais nas amostras de leite materno foi determinada de acordo com o método de Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão (BARNES, et al., 1985), método recomendado para quantificação de proteínas em leite (ZAIA et al, 1998). A curva de calibração foi construída com concentrações de 10 a 100 g L⁻¹ a partir de solução estoque de albumina bovina (100 g L⁻¹). Para a quantificação, em cubetas de plástico um total de 50µL de amostra/padrão foi misturado a 2,5 mL do reativo de Biureto, a mistura foi mantida banho-maria a 32 °C por 10 min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras foram feitas em 545 nm, usando espectrofotômetro UV/Visível.

4.6.3. Separação eletroforética por SDS-PAGE

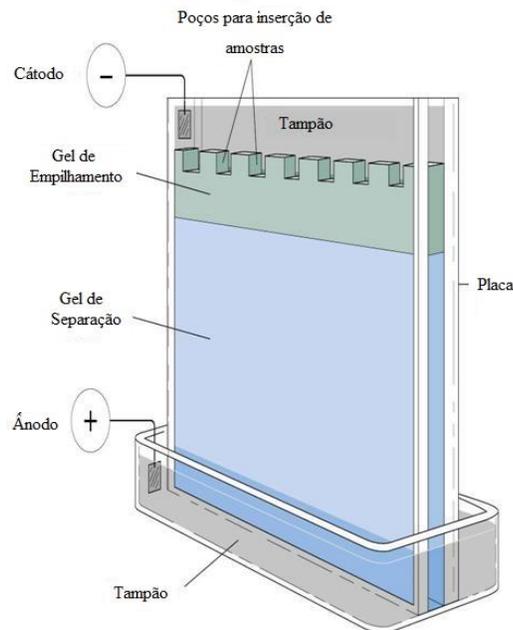
O procedimento de eletroforese, dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE), foi feito objetivando o fracionamento das proteínas de acordo com suas massas molares em gel de poliacrilamida. A separação eletroforética foi feita utilizando um mini sistema de eletroforese vertical (Hoefer miniVE, GE, USA), com sistema descontínuo, onde são utilizados dois géis de diferentes concentrações, o gel de empilhamento (4-5%) e o gel de separação (12,5%) (RAIMONDO et al., 2013).

O gel de separação (12,5%) foi preparado com 1,26 g de Acrilamida e 36,6 mg de N, N'-metilenobisacrilamida em 1 mL de Tris-HCl pH 8,8, 100 µL de SDS 10% (m/v), 4,6 mL de água ultrapura, 68 µL persulfato de amônio 10% (m/v) e 9 µL de TEMED e em seguida o mesmo foi aplicado na placa. Para o nivelamento do gel foram utilizados, cerca de 100 µL de isopropanol.

Após completa polimerização do gel de corrida o excesso de isopropanol foi retirado e aplicou-se o gel de empilhamento (4 a 5%), o qual foi preparado com 510 mg de Acrilamida, 13,6 mg de N, N'-metilenobisacrilamida em 1 mL de Tris-HCl, pH 8,8, 100 μ L de SDS 10% (m/v), 7,6 mL de água ultrapura, 68 μ L de persulfato de amônio 10% (m/v) e 11 μ L de TEMED.

Após completa montagem do sistema de eletroforese (**Figura 6**), o tampão de corrida foi aplicado na parte inferior e superior do sistema para permitir a passagem da corrente elétrica, fazendo com que as proteínas migrassem no gel. Sendo este tampão composto por 3,03 g de Tris-hidroximetil amino metano, 14,41 g de glicina e 1 g de SDS em 100 mL de água ultrapura.

Figura 6 – Sistema de eletroforese – SDS-PAGE.



Fonte: Biyokure (2014) – Adaptado.

Antes da aplicação das amostras no gel de poliacrilamida faz-se necessário a desnaturação das proteínas (DUNBAR, 1987), para tanto dodecilsulfato de sódio foi escolhido como agente desnaturante. O ditioneitol (DTT) foi utilizado como agente redutor, protegendo possíveis grupos tióis durante o processo de fracionamento (BRECHT et al., 2003). Cada extrato foi diluído em um tampão composto por 2,8 mg de DTT em 1 mL de solução tampão composta por 6,6 mL de Tris-HCl 1 mol.L⁻¹(pH 6,8), 5 mL de glicerol a 50% (v/v), 2 mL de SDS a 10% (m/v), 1 mL de azul de bromofenol a 1% (m/v) e 1,4 mL de água ultrapura, de forma a obter 6 μ g μ L⁻¹ de

proteína total. Essa mistura foi homogeneizada com o auxílio de agitador por efeito Vórtex. Após diluição, 10 µL de extrato foram aplicados em gel de poliacrilamida, pré-fabricado. Aplicou-se também 10 µL o padrão de massa molar β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa) - 0,5% (m/v). Aplicadas as amostras, a separação eletroforética foi realizada seguindo a programação descrita na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Programação da SDS-PAGE para separação das proteínas.

Etapa	Tensão (V)	Corrente elétrica (mA)	Tempo (min)
1 ^a	80	200	15
2 ^a	160	200	79

Após o término da separação eletroforética, os géis foram corados durante 4 horas, sob agitação moderada, utilizando solução de Comassie Blue R-250 em 45% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético glacial e 45% de água ultrapura. Posteriormente, os géis foram descorados em solução descorante composta por 10% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 80% de água deionizada até obter-se um fundo claro. Em seguida os géis foram digitalizados utilizando Scanner para gel ImageScanner III.

As separações de proteínas por eletroforese SDS-PAGE foram feitas em três repetições, sendo que cada corrida continha dois géis (G1 e G2). No primeiro gel (G1), foram aplicadas 5 amostras e no segundo gel 4 amostras, de acordo com a **Tabela 7**.

Tabela 7 – Amostras aplicadas nos géis de poliacrilamida para corridas eletroforética.

Géis	Amostras aplicadas
G1	1, 2, 3, 4 e 5
G2	6, 7, 8 e 9

4.6.4. Tratamento de imagens

Após escaneamento, os géis foram processados por análise de imagens (Image Analysis software, ImageQuantTM TL, Versão 8.1, GE Healthcare Life Sciencis, EUA), para quantificação da densidade óptica de cada fração proteica (bandas proteicas) obtida. Com base em 100% da densidade óptica do total da corrida, foi calculado o resultado da percentagem de cada banda proteica, tendo-se descontado o background (fundo sem coloração) na coluna. Na identificação da massa molecular das bandas proteicas foi utilizado o marcador de massa molecular conhecido

(GE Healthcare Life Sciences, UK) com 6 bandas de variação, entre 14,4 e 97 kDa. As bandas identificadas foram recortadas para determinação de concentrações de HgT por GFAAS.

4.6.4.1. Estimativa da Mobilidade Relativa (Rf) e Massa Molecular

Para estimar a massa molecular construiu-se uma curva de calibração do log da massa molecular do marcador, de massa molar conhecida, em função da mobilidade relativa (Rf) (BRACHT et al., 2003; KIM et al., 2005). O Rf do padrão proteico foi determinado pela seguinte equação (**Equação 3**):

$$Rf = \frac{\text{Distância de migração do padrão proteico}}{\text{Distância de migração do azul de bromofenol}} \quad (3)$$

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos se dividem em paramétricos e não paramétricos. Os testes paramétricos exigem que os dados analisados tenham uma distribuição normal, tendo em vista que utilizam parâmetros da distribuição, ou sua estimativa, para realização dos cálculos estatísticos. Em contrapartida, os testes não paramétricos não exigem a normalidade dos dados, isto porque utilizam postos atribuídos aos dados ordenados para realização dos cálculos (REIS & RIBEIRO JUNIOR, 2007).

Dessa forma, para os dados deste estudo foi realizado teste Shapiro-Wilks no intuito de verificar sua normalidade, sendo o valor α adotado para o nível de significância foi de 0,05 (5%). Considerando que quanto menor o valor de p , menor a consistência entre os dados e a hipótese nula (H_0), a qual infere pela normalidade dos dados (LOPES et al., 2013).

Os dados de HgT no cabelo ($\mu\text{g g}^{-1}$), HgT no leite ($\mu\text{g L}^{-1}$), idade das lactantes, tempo de lactação (dias) e concentração de proteínas totais em leite (g L^{-1}) apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$). Contudo, os dados de frequência de consumo de peixes não apresentaram distribuição normal ($p \leq 0,05$), assim como os dados obtidos por meio do fracionamento de proteínas, (intensidade da banda, Rf, massa molar (kDa), massa de proteína (μg) e concentração de HgT nas bandas). Dessa forma, devido heterogeneidade de algumas variáveis e à diferença de unidades, optou-se pela utilização de testes estatísticos não paramétricos.

O teste não paramétrico de correlação de Speraman, o qual avalia a relação entre duas variáveis sem fazer suposições sobre distribuição e frequência, foi utilizado no intuito de avaliar a correlação entre as variáveis: concentrações de HgT no cabelo *vs* frequência do consumo de peixe, concentrações de HgT no cabelo *vs* idade das lactantes, concentrações de HgT no cabelo *vs* concentrações de HgT no leite, concentrações de HgT no leite *vs* tempo de lactação, concentrações de proteínas totais *vs* tempo de lactação, concentração de HgT nas bandas *vs* massa de proteína, e concentração de HgT nas bandas *vs* massa molar; sendo o nível de significância fixado em $p < 0,05$.

O teste não paramétrico Mann-Whitney é utilizado para verificar a igualdade entre as medianas de duas populações contínuas e independentes, sendo que as duas amostras comparadas não precisam, necessariamente, apresentar a mesma dimensão. Trata-se de um teste não paramétrico equivalente à ANOVA (BIANCONI et al., 2008). Dessa forma, este teste foi utilizado para verificar a igualdade/repetibilidade dos géis nas diferentes corridas. Para tanto, foram comparados os valores de volume, massa molar a Rf das bandas entre as 3 corridas para os 2 géis (G1 e G2). O nível de significância adotado para esta análise foi de 5% ($p < 0,05$).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Statistica Trial Version 10.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Em função do número de mulheres lactantes residentes nas comunidades estudadas, nos períodos de amostragem, e pelo estudo depender do voluntariado das mesmas, a população amostral deste estudo foi composta por 9 mulheres, com idade média de 28 ± 8 anos, variando entre 17 e 39 anos. O tempo de lactação variou entre 20 e 70 dias, com média de 42 ± 20 dias. Apenas 33% das participantes declararam estar trabalhando, 56% se autodefiniram como donas de casa, 1 participante declarou ainda ser estudante e apenas 1 declarou ter vivido e/ou trabalhado em regiões de garimpo na bacia do rio Madeira, apesar de ninguém declarar ter tido atividades garimpeiras ao longo do último ano.

No que se refere ao grau de instrução, apenas 1 participante declarou ter ensino superior completo, 22% finalizaram o ensino médio e 66% possuíam apenas ensino fundamental completo ou incompleto.

Nenhuma das participantes declarou fazer uso de cigarro e apenas 22% consomem algum tipo de bebida alcóolica em ocasiões especiais.

5.1.1. Hábito alimentar

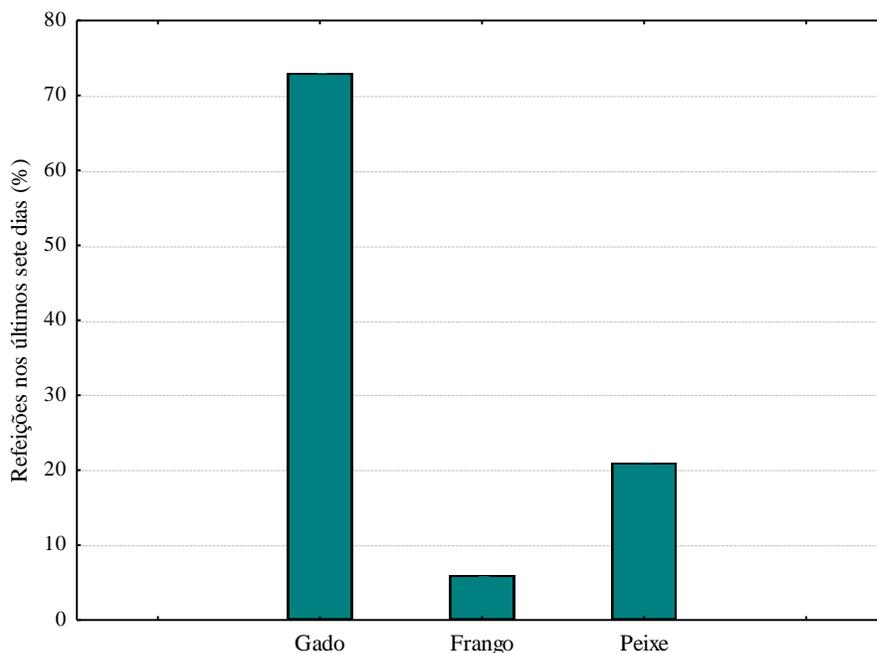
Diversos estudos têm mostrado que parte expressiva das exposições ambientais ao Hg na Amazônia se dá por via alimentar (SOUZA et al., 2000; ZHANG & WONG, 2007), isso devido à maior concentração de mercúrio nos recursos pesqueiros. Assim, torna-se importante examinar o perfil alimentar da população em estudo, a fim de documentar a importância desta via de exposição.

Utilizando questionários de frequência alimentar, realizou-se o inquérito recordatório do consumo de diversos alimentos ao longo dos 7 dias anteriores ao momento da entrevista, além de perguntas abertas sobre quais fontes de proteína animal as participantes mais baseiam sua alimentação. Com base nessa metodologia, e principalmente neste último parâmetro de fontes de proteína animal, observou-se que a maioria das participantes tem na carne bovina sua principal fonte de proteína (6 participantes), seguida de frango (2 participantes), e somente 1 participante declarou ter peixe como principal fonte de proteína animal.

Ao considerar a frequência do consumo de carne de gado, frango e peixe ao longo dos 7 dias anteriores ao inquérito, tem-se que a carne de gado como a mais consumida (73% das refeições), seguida da carne de peixe (21% das refeições) e de frango (apenas 6% das refeições), conforme ilustrado na figura a seguir (**Figura 7**).

O Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico da UHE Jirau, o qual faz o acompanhamento e monitoramento dos níveis de concentração de Hg em bioindicadores de exposição humana, assim como seus determinantes alimentares, sociodemográficos e ambientais, na área de influência da Usina Hidrelétrica Jirau, compreendendo as comunidades de Nova Mutum, Vila Jirau, Abunã e Fortaleza do Abunã, relata comportamento semelhante ao perfil alimentar da população amostral deste trabalho, indicando que, apesar de relativamente pequeno, o grupo amostral do trabalho aqui exposto representa a população da área de estudo (ESBR, 2015).

Figura 7 – Frequência no consumo de carne de gado, frango e peixe, pelas participantes nos últimos 7 dias à entrevista.



Segundo dados do estudo de saúde humana do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico da UHE Jirau, na fase enchimento do empreendimento (período de outubro de 2012 a maio de 2014), a maioria das pessoas tem a carne bovina como sua principal fonte de proteína animal (459 pessoas, 65,1%), seguida de frango (122 pessoas, 17,3%), e somente 60 pessoas (8,5%) declararam ter consumido algum tipo de peixe (ESBR, 2015).

5.2. EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

5.2.1. Mercúrio total no cabelo

A **Figura 8** apresenta a distribuição das concentrações de HgT determinados nas amostras de cabelo das participantes. As concentrações de HgT no cabelo (**Tabela 8**) apresentaram média de $3,05 \pm 1,02$, variando entre 1,51 e $4,43 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo inferior ao limite preconizado pela Organização Mundial da Saúde, de $14 \mu\text{g}$ de Hg por grama de cabelo como indicadora de possíveis efeitos neurotóxicos que poderiam ser esperados na população (FAO/WHO, 2004).

Figura 8 – Distribuição das concentrações de HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.

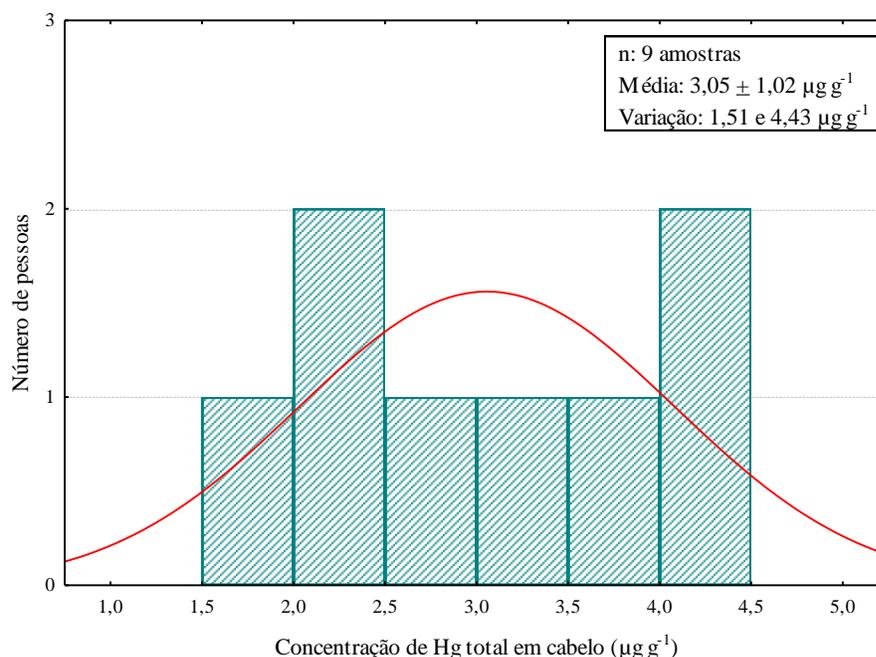


Tabela 8 – Concentração de HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de cabelo de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.

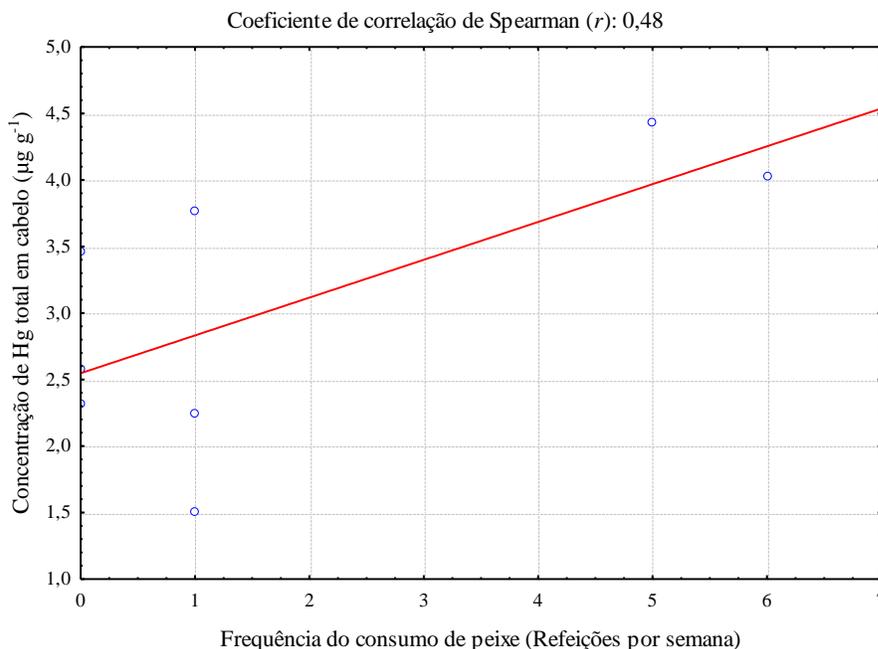
Comunidades	Lactante	HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Abunã	1	4,03
Abunã	2	*
Abunã	3	3,77
Vila Jirau	4	2,25
Abunã	5	2,32
Fortaleza do Abunã	6	4,43
Fortaleza do Abunã	7	1,51
Nova Mutum Paraná	8	2,58
Vila Jirau	9	3,47

*Não foi possível quantificar.

Pesquisas na Amazônia apontam para elevadas concentrações de Hg nos peixes piscívoros, sendo observados valores médios de $0,669 \text{ mg kg}^{-1}$, e como consequência também elevadas concentrações de Hg em amostras de cabelo da população ribeirinha da Amazônia (média de $19,1 \mu\text{g g}^{-1}$) em cuja alimentação o consumo do peixe é predominante (SOUZA et al., 2000). Neste contexto, por meio de análise não paramétrica de correlação (Spearman), buscou-se avaliar a relação entre as concentrações de HgT em cabelo e o consumo de peixe pelas lactantes. Apesar de ser observada correlação positiva entre o consumo de peixe e as concentrações de HgT em cabelo ($r = 0,48$) (**Figura 9**), a mesma não se mostrou significativa ($p = 0,18$). Também não

foi observada correlação significativa entre as concentrações de HgT no cabelo e a idade das lactantes por meio da análise de correlação não-paramétrica de Spearman ($r = 0,19$, $p = 0,61$), resultados estes, possivelmente, decorrentes do baixo número amostral deste estudo.

Figura 9 – Correlação entre as concentrações de HgT ($\mu\text{g g}^{-1}$) em cabelo humano e a frequência de consumo de peixe (Spearman, $p < 0,18$).



No geral, as concentrações são muito semelhantes às relatadas nos estudos de saúde humana do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico de Mercúrio da UHE Jirau, onde variaram entre 0,1 e 18,5, com média $3,2 \pm 1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (ESBR, 2015). Contudo, a média de HgT no cabelo das lactantes aqui analisados foram mais baixas que valores documentados para comunidades da região amazônica. Pinheiro et al., (2005) reportou concentrações de 8,3 a $9,4 \mu\text{g g}^{-1}$ no rio Tapajós. Barbosa et al. (1997) determinou concentrações de HgT em amostra de lactantes residentes às margens do rio Madeira, observando concentração média de $14,3 \mu\text{g g}^{-1}$.

Boischio e Barbosa (1993) investigaram 150 famílias ao longo de 170 km do rio Madeira, a jusante de Porto Velho, sendo amostrado cabelo de 311 indivíduos, e os resultados mostraram que 70,4% dos indivíduos ($n=219$) apresentaram valores menores que $15 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que 27% dos indivíduos ($n=84$) na faixa de 15 a $50 \mu\text{g g}^{-1}$ e 2,6% dos indivíduos ($n=8$) valores acima de $50 \mu\text{g g}^{-1}$. Boischio e colaboradores (2000) avaliaram também o nível de Hg em uma família residente às margens do alto rio Madeira e encontraram elevadas concentrações, com picos de até

339 ppb. Faial e colaboradores (2014) analisaram as concentrações de Hg em amostras de cabelo de 141 voluntários da comunidade Barreiras, ribeirinhos do rio Tapajós, onde os resultados mostraram uma variação de 2,07 a 24,93 para os homens e de 4,84 a 27,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ para mulheres.

Ao analisar as concentrações de mercúrio total nas amostras de cabelo das lactantes participantes deste estudo, observam-se valores abaixo das médias gerais observadas em várias regiões da Amazônia, provavelmente por se tratar de um grupo que tem vivido dividida entre a Amazônia dos Rios (ribeirinha) e a Amazônia das Estradas, assim como retratado no estudo de saúde humana do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico da UHE Jirau. Considerando que as participantes não têm atividades em áreas de garimpo de ouro e, por conseguinte, sua principal fonte de exposição ao Hg se dá por via alimentar, as baixas podem ser decorrentes do baixo consumo de peixe.

5.2.2. Mercúrio total no leite materno

As concentrações de HgT determinadas no leite materno (**Tabela 9**) apresentaram média de $5,85 \pm 1,20 \mu\text{g L}^{-1}$, variando entre 3,70 e $7,40 \mu\text{g L}^{-1}$. A **Figura 10** apresenta a distribuição das concentrações de HgT determinados nas amostras de leite das participantes.

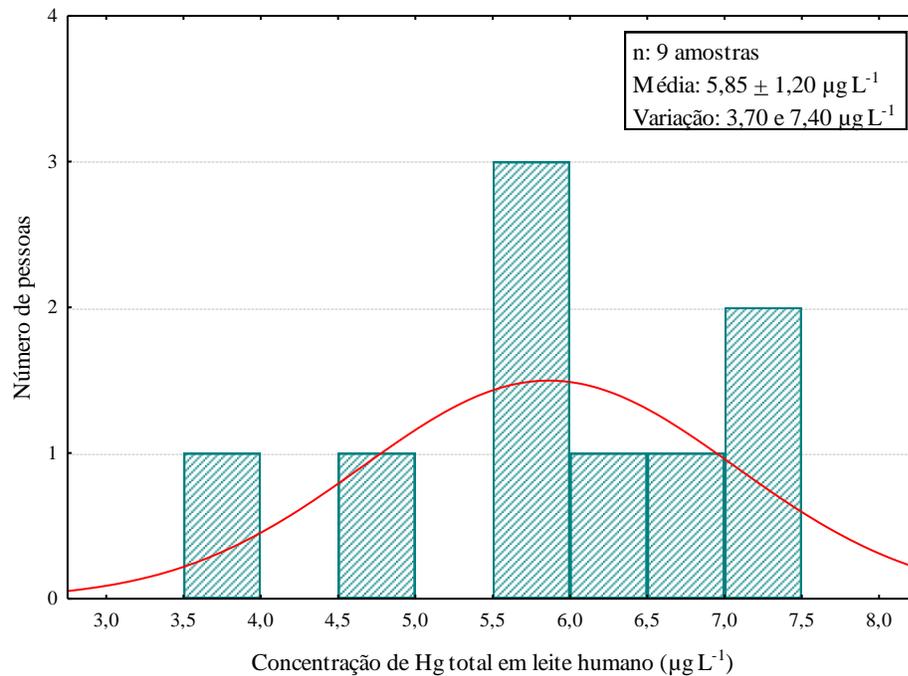
Tabela 9 – Concentrações de HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.

Comunidades	Lactantes	HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Abunã	1	$4,60 \pm 0,09$
Abunã	2	$3,70 \pm 0,03$
Abunã	3	$7,10 \pm 0,04$
Vila Jirau	4	$5,51 \pm 0,08$
Abunã	5	$7,40 \pm 0,01$
Fortaleza do Abunã	6	$6,71 \pm 0,03$
Fortaleza do Abunã	7	$6,44 \pm 0,03$
Nova Mutum Paraná	8	$5,66 \pm 0,02$
Vila Jirau	9	$5,51 \pm 0,01$

A análise não-paramétrica de correlação de Spearman foi aplicada no intuito de avaliar a relação entre as concentrações HgT em amostra de leite e as concentrações de HgT em amostras de cabelo e o período de lactação. Apesar da literatura indicar que as concentrações no leite materno são sensíveis à exposição materna (DÓREA e DONANGELO, 2006; VIERIA et al., 2013), não se observou correlação significativa das concentrações de HgT no leite com o HgT no

cabelo ($r = -0,06$, $p = 0,89$). O período de lactação também não se correlacionou com as concentrações de HgT encontradas nas amostras de leite ($r = 0,14$, $p = 0,65$). Resultados estes, possivelmente, decorrem da reduzida população amostral deste estudo.

Figura 10 – Distribuição das concentrações de HgT ($\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.



A Organização Mundial da Saúde estabelece concentrações máximas de metais em alimentos, sendo considerado o limite de ingestão tolerável (PTWI) de $5 \mu\text{g/kg}$ peso corpóreo/semana, ou $0,71 \mu\text{g/kg}$ peso corpóreo /dia de HgT (FAO/WHO, 2010). Para avaliar os riscos da exposição ao Hg pelo consumo de leite é necessário ter conhecimento da concentração de HgT no leite, do consumo do leite pelo bebê e de seu peso corpóreo (JARDIM e CALDAS, 2009).

Tendo em vista que dados de peso e volume de leite consumido pelos bebês não foram coletados, optou-se por utilizar dados indicados por Da Costa e colaboradores (2005), ou seja, peso corpóreo médio de 4 kg e o volume médio consumido de 150 g de leite humano / kg de peso corpóreo. Dessa forma, tem-se que a concentração máxima de HgT no leite deve ser igual ou inferior a $4,73 \mu\text{g L}^{-1}$, para que não ultrapasse o PTWI (FAO/WHO, 2010). Portanto,

aproximadamente 89% das amostras de leite ultrapassam o PTWI, o que pode representar risco de exposição dos bebês pelo consumo de leite das lactantes participantes deste estudo.

Entretanto, as comparações de exposição frente ao PTWI devem ser consideradas com restrições devido ao pequeno grupo amostral e a falta de informações descritivas sobre consumo do leite e o peso corpóreo dos indivíduos alimentados pelas lactantes das comunidades tradicionais do alto rio Madeira. Além disso, as concentrações de mercúrio no leite materno encontradas nesta população estão condizentes com os resultados relatados na literatura científica para a região Amazônica.

Barbosa e Dórea (1998) avaliaram a contaminação por Hg em 47 lactantes ao longo do rio Madeira, observando concentrações em leite materno de 0 a 24,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Mais recentemente, Vieira et al. (2013), investigaram fontes de exposição ao Hg em dois grupos, um urbano e outro rural, residentes na região do rio Madeira. Foram coletadas amostras de leite de 75 lactantes na área urbana e 82 na área rural, e os resultados mostraram concentração média mais baixa das lactantes urbanas (0,36 $\mu\text{g kg}^{-1}$), entre 0,09 e 3,74 $\mu\text{g kg}^{-1}$, quando comparadas às rurais (2,30 $\mu\text{g kg}^{-1}$), entre 0,12 e 6,48 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo os menores valores justificados pelo baixo consumo de peixe das lactantes urbanas.

Fato é que a presença de Hg em leite materno é um fator de risco importante para possíveis efeitos neurológicos em crianças, contudo a amamentação é essencial no desenvolvimento neurológico do recém-nascido. Estudos tem mostrado que os níveis de exposição da criança estão mais relacionados com as concentrações de mercúrio encontradas em amostras de cabelo das mães, que com as concentrações no leite (SYVERSEN et al. 2012). Devido ao baixo consumo de peixe pelas lactantes do presente estudo, as amostras de cabelo apresentaram concentrações abaixo do limite preconizado pela WHO e abaixo da média da região Amazônica, o que talvez possa sugerir baixa exposição das crianças também. Contudo, seria necessário a determinação de HgT nas crianças para que se tivessem maiores conclusões.

Além disso, a exposição ao Hg poder ocorrer a partir de outras fontes, como por meio de vacinas, por exemplo, que fazem uso de Timerosal (DÓREA et al., 2011; VIEIRA et al., 2013). Dessa forma, ao estudar a exposição de crianças ao Hg e seus efeitos neurológicos é preciso considerar as mais diversas fontes deste metal, além da possibilidade de contaminação por outros metais neurotóxicos aos quais a mãe possa ser exposta, como o chumbo (Pb), por exemplo (DÓREA, 2004). Em suma, a contaminação por Hg é um fato na região amazônica, e crianças

são mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos deste metal, o que as torna um grupo de risco que merece a devida atenção em programas de biomonitoramento.

5.3. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS

5.3.1. Determinação de proteínas totais

A quantificação da concentração total de proteínas nos extratos proteicos provenientes da centrifugação das amostras de leite materno possibilita calcular a massa proteica a ser aplicada no gel de poliacrilamida, levando em consideração a concentração do gel (12,5%).

A concentração total de proteína nos extratos proteicos (**Tabela 10**) para as 9 amostras apresentaram média de $15,18 \pm 2,00 \text{ g L}^{-1}$, variando entre 12,17 e $18,39 \text{ g L}^{-1}$. As amostras de leite deste estudo foram coletadas das lactantes entre 20 e 70 dias de lactação, período este classificado como leite maduro, de acordo com Ballard et al. (2013).

Tabela 10 – Concentração total de proteínas em extratos de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.

Comunidades	Lactantes	Concentração de proteína (g L^{-1})
Abunã	1	$12,49 \pm 0,57$
Abunã	2	$15,58 \pm 1,54$
Abunã	3	$16,70 \pm 3,45$
Vila Jirau	4	$16,72 \pm 3,90$
Abunã	5	$15,10 \pm 4,45$
Fortaleza do Abunã	6	$14,98 \pm 1,96$
Fortaleza do Abunã	7	$14,49 \pm 0,84$
Nova Mutum Paraná	8	$18,39 \pm 2,44$
Vila Jirau	9	$12,17 \pm 0,08$

Laurindo et al. (1992), revisou estudos na área e definiu concentrações médias de proteínas nos diferentes períodos de lactação, sendo no colostro de 12 g L^{-1} , no leite de transição 15 g L^{-1} , e no leite maduro, $5,5 \text{ g L}^{-1}$. Pozzi (2013), determinou a concentração de proteínas de 5 lactantes da área de abrangência do Centro Policlínica Central (CSI) de Botucatu-SP e relatou as concentrações médias de proteínas no leite materno maduro de $18,69 \text{ g L}^{-1}$. Ballard et al. (2013), estudaram a composição de macronutrientes em leite maduro, de acordo com literatura especializada, estimando a concentração de 9 a 12 g L^{-1} de proteína nesta fase de lactação. As concentrações médias de proteínas nas amostras desse estudo estão de acordo com a literatura científica, entretanto a análise não-paramétrica de correlação (Spearman) não indicou correlação

significativa entre a concentração de proteínas e o tempo de lactação ($r = -0,31$, $p = 0,40$), possivelmente por se tratarem de lactantes diferentes e devido à composição do leite, que pode variar em cada mãe, associado ao fato da reduzida população amostral deste estudo.

5.3.2. Separação eletroforética

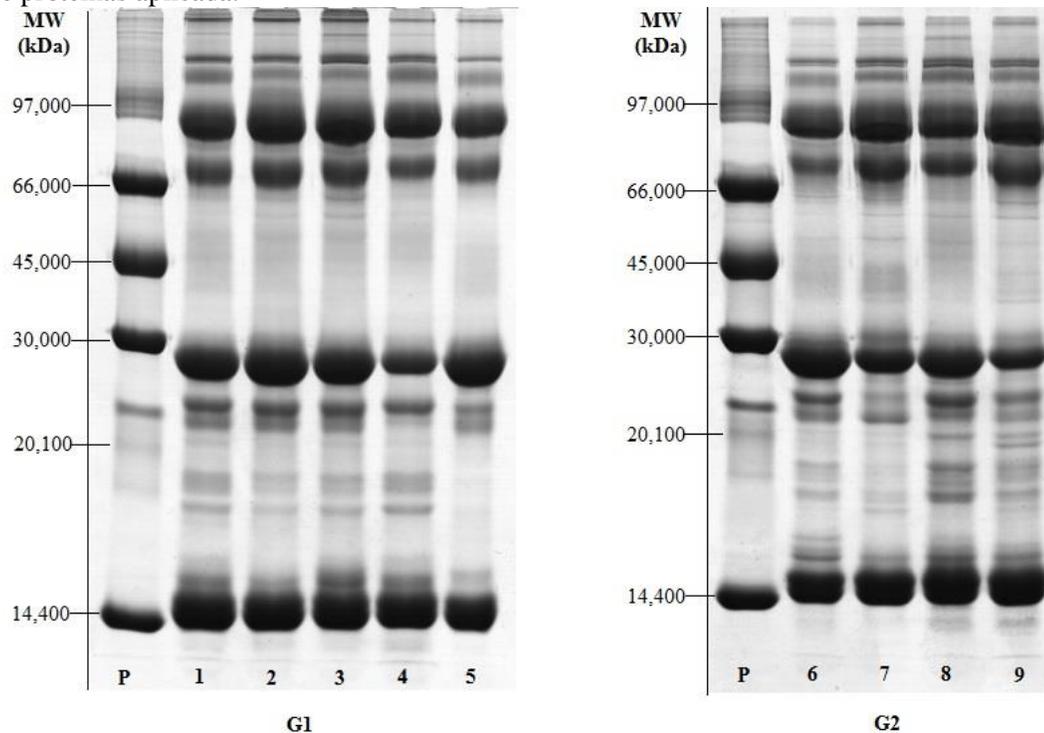
No preparo das amostras para a separação por SDS-PAGE são utilizadas várias técnicas na obtenção do extrato proteico, alguns autores utilizam processos de precipitação de proteínas a fim de obter apenas aquelas de maior ou menor massa molar e eliminar possíveis interferentes das corridas, como o caso da precipitação com acetona (LIMA et al., 2010; MORAES et al., 2014). Entretanto, neste trabalho optou-se por não fazer nenhum tipo de precipitação, sendo o extrato proteico obtido por meio de centrifugação, seguindo protocolo descrito por Lonnerdal e Forsum (1985 – adaptado).

Estudos prévios foram executados para determinação da concentração de proteína total a ser aplicada em gel de poliacrilamida visando obter a melhor separação eletroforética das proteínas. Assim, a melhor condição de separação foi observada quando aplicado 60 μ g de proteína total em gel de poliacrilamida, sendo essa concentração adotada para este estudo. Dessa forma, a diluição das amostras foi feita de forma que a concentração de proteínas totais resultante fosse a mesma para todas, de 60 μ g proteína total.

Os géis obtidos nas corridas eletroforética (3 corridas) foram utilizados no mapeamento de Hg nas bandas proteicas. As imagens dos géis para as condições otimizadas são mostradas na **Figura 11**.

O corante azul brilhante de coomassie (R-250) é utilizado para possibilitar a identificação das bandas proteicas. Quando adicionado no gel juntamente à amostra, o corante forma um complexo ao interagir com as cadeias laterais básicas e aromáticas das proteínas, por meio dessa interação ocorre o deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA et al, 1998). Antes do processo de detecção e seleção das bandas proteicas nos géis, fez-se necessária a remoção deste corante por meio de uma solução decolorante. Dessa forma, elimina-se o excesso de corante contribuindo para a diminuição do fundo (background). A alta densidade de fundo e a incerteza na delimitação das bandas (ou spots, no caso da 2D-PAGE) poderia dificultar as análises das imagens levando a resultados equivocados (CLUTER et al., 2003; WRIGHT et al., 2012).

Figura 11 – Géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtidos por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, nas condições otimizadas para a massa de proteínas aplicada.

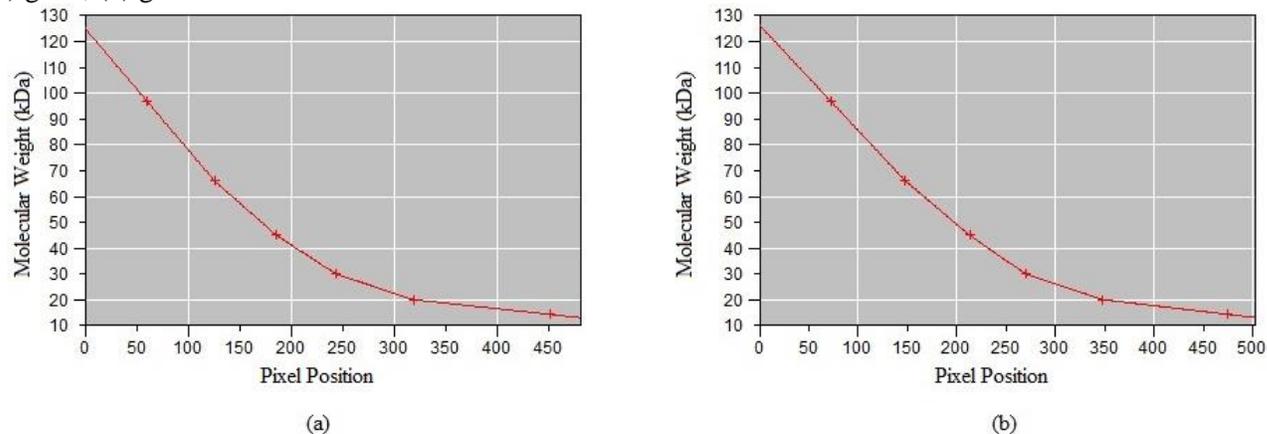


Na estimativa da massa molecular construíram-se curvas de calibração para cada corrida. As curvas obtidas na primeira corrida para os géis 1 e 2 estão apresentadas na **Figura 12**. A distância relativa de migração (Rf) das proteínas nos géis, ou seja, o movimento das mesmas através do gel (BRACHT et al., 2003), foi semelhante para as diferentes amostras e corridas. O Rf médio de início foi $0,018 \pm 0,009$ e mediana 0,017, variando entre 0,008 e 0,036, e do fim da migração $0,955 \pm 0,022$ e mediana 0,949, variando entre 0,914 e 0,987.

O teste não paramétrico Mann-Whitney foi realizado com a finalidade de verificar a existência de diferenças entre as 3 repetições dos géis 1 e 2, sendo o valor de alfa adotado para o nível de significância de 0,05 (5%). Neste caso, não se observou diferença significativa entre as repetições ($p > 0,5$) dos dois géis, aceitando-se a hipótese nula, onde se infere pela semelhança entre as repetições nas variáveis consideradas (volume, massa molar e Rf de cada banda), indicando boa repetibilidade das corridas.

Figura 12 – Curvas de calibração da proteína em função da distância de migração.

(a) gel 1; (b) gel 2.



As amostras apresentaram grande diversidade de bandas proteicas, em média $35,78 \pm 4,56$ bandas por amostra, variando entre 24 e 40 bandas, sendo observado a maior intensidade de proteínas em 3 regiões distintas dos géis, a primeira com massa molar entre 14,40 e 15,00 KDa (em média 15% das proteínas no gel), a segunda entre 22,02 a 28,47 kDa (em média 19% das proteínas no gel) e a terceira entre 84,43 a 92,08 kDa (em média 15% das proteínas no gel), conforme observado nas **Figuras 13, 14 e 15**.

Figura 13 – Detecção das bandas proteicas em géis de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtidos por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.

(a) Gel 1; (b) Gel 2.

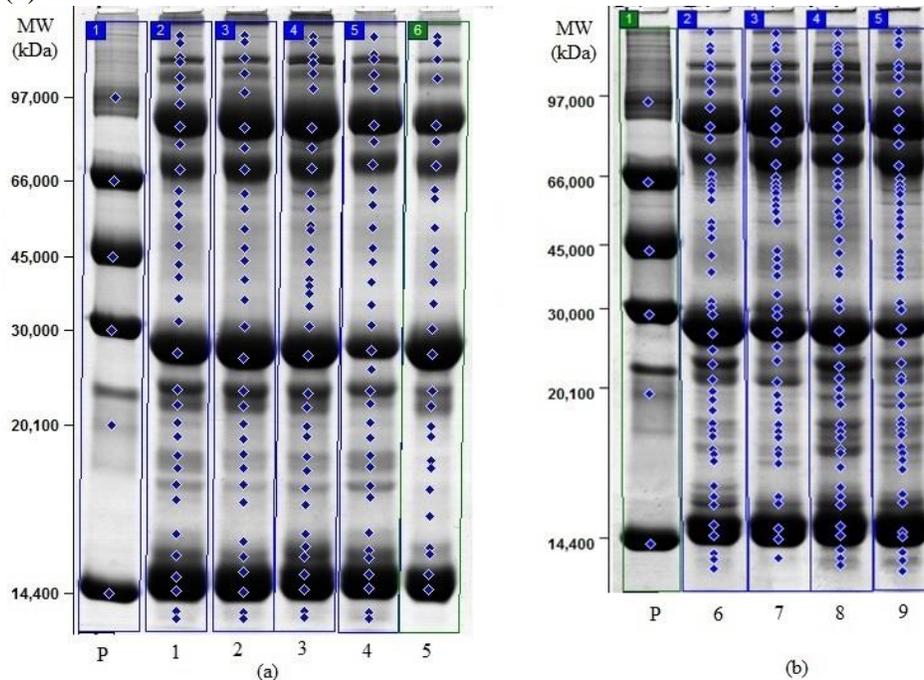


Figura 14 – Eletroforetograma das proteínas de leite materno obtida em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE) – Gel 1.

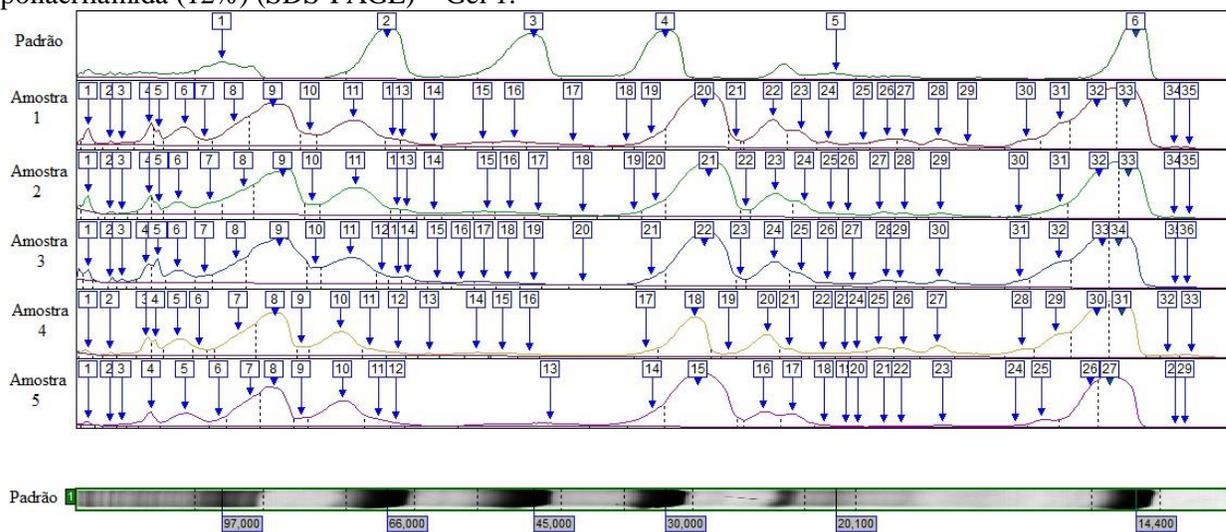
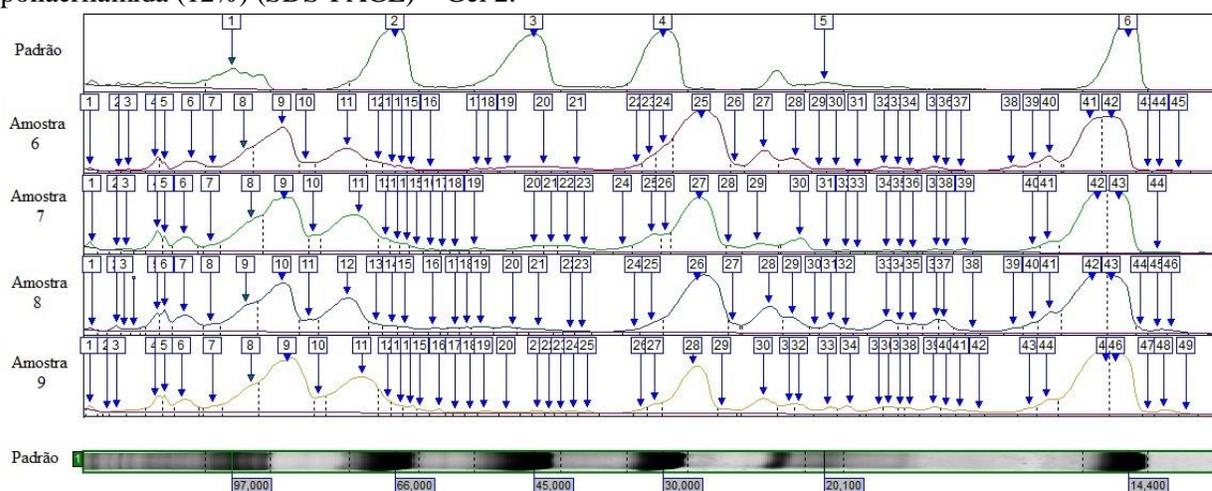


Figura 15 – Eletroforetograma das proteínas de leite materno obtida em corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE) – Gel 2.



5.3.3. Determinação de mercúrio total nas bandas proteicas

Na **Tabela 11** são apresentadas os valores de concentração de HgT determinados em cada banda proteica, assim como suas respectivas massas de proteína, além das massas molares determinadas utilizando-se o programa ImageQuantTM TL 8.1.

Das 164 bandas analisadas abaixo de 30 kDa, 77 apresentaram mercúrio, com diferente distribuição entre as amostras, sendo a concentração média de $1,18 \pm 2,43$ e mediana $0,49 \text{ mg g}^{-1}$, variando entre $0,02$ e $18,73 \text{ mg g}^{-1}$. Considerando as 3 regiões distintas dos géis com maior

concentração de proteínas, a primeira região (14,40 a 15,00 kDa) apresentou concentração média de $0,25 \pm 0,30$ e mediana $0,10 \text{ mg g}^{-1}$, variando entre $0,02$ e $0,98 \text{ mg g}^{-1}$, na segunda região (22,02 a 28,47 kDa) a concentração média foi $0,77 \pm 1,13$ e mediana $0,44 \text{ mg g}^{-1}$, variando entre $0,04$ e $4,12 \text{ mg g}^{-1}$ e na terceira região (84,43 a 92,08 kDa) não foi quantificado mercúrio.

Tabela 11 – Concentração de HgT, massa molar e massa de proteínas das bandas proteicas obtidas por SDS-PAGE.

Lactante	Banda proteica	Massa molar (kDa)	Massa de proteína (μg)*	Concentração de Hg (mg g^{-1})**
1	13	13,79	0,32	6,88
1	14	14,64	37,71	0,06
1	15	15,86	6,44	0,37
1	16	16,52	1,97	1,34
1	17	17,86	2,57	0,68
1	19	19,03	3,85	0,77
1	20	20,55	10,16	0,13
1	32	32,11	41,27	0,09
2	14	14,35	33,96	0,07
2	15	15,91	2,34	0,74
2	17	17,64	1,69	0,97
2	19	19,59	3,53	1,24
2	22	22,05	6,68	0,47
2	24	24,89	6,48	0,63
3	13	13,61	0,22	2,87
3	14	14,36	42,74	0,02
3	15	15,69	9,07	0,20
3	16	16,65	1,46	1,57
3	17	17,71	1,51	1,28
3	18	18,81	2,63	0,67
3	20	20,38	1,63	1,14
3	23	23,80	8,90	0,18
3	33.1	33,56	2,74	0,16
3	33.2	22,08	5,12	0,35
4	15	15,69	9,52	0,11
4	16	16,36	2,20	0,28
4	17	17,81	3,45	0,06
5	14	14,49	27,27	0,05
5	19	19,74	0,92	2,03
5	33	33,42	3,81	0,15
6	13	13,78	0,49	4,22
6	14	14,58	31,51	0,09
6	15	15,87	4,39	0,59

Tabela 12 – Concentração de HgT, massa molar e massa de proteínas das bandas proteicas obtidas por SDS-PAGE – Continuação.

Lactante	Banda proteica	Massa molar (kDa)	Massa de proteína (µg)*	Concentração de Hg (mg g ⁻¹)**
6	18	18,28	2,86	0,58
6	19	19,70	2,20	0,82
7	13	13,69	0,09	18,73
7	14	14,47	24,47	0,03
7	15	15,93	2,55	0,98
7	16	16,46	0,34	4,32
7	17	17,46	0,57	1,68
7	18.1	18,15	0,47	2,83
7	18.2	18,77	0,27	3,42
7	19	19,23	0,38	3,54
7	20	20,17	0,95	1,17
7	22	22,33	2,85	0,87
7	24	24,52	1,53	0,44
7	26	26,36	0,72	2,62
7	28	28,05	15,96	0,05
7	32	32,34	3,74	0,17
8	13	13,53	0,95	0,49
8	15	15,87	5,83	0,08
8	16	16,49	1,32	0,65
8	17.1	17,37	0,86	0,27
8	17.2	17,97	2,88	0,24
8	18	18,52	1,69	0,49
8	19	19,04	3,41	0,16
8	20	20,19	4,11	0,23
8	23	23,27	8,74	0,04
8	25	25,43	1,45	0,15
8	27	27,17	22,88	0,04
8	32	32,26	2,23	0,34
9	13	13,52	0,92	0,32
9	14	14,48	26,65	0,05
9	16	16,23	0,55	2,23
9	17	17,13	0,60	0,97
9	18	18,00	1,08	0,56
9	19.1	19,03	1,77	0,45
9	19.2	19,76	0,68	1,18
9	20	20,47	1,07	1,23
9	22	22,52	2,08	0,63
9	24	24,53	1,92	0,83
9	25	15,75	2,17	0,10
9	26	26,46	0,26	4,12

Tabela 12 – Concentração de HgT, massa molar e massa de proteínas das bandas proteicas obtidas por SDS-PAGE – Continuação.

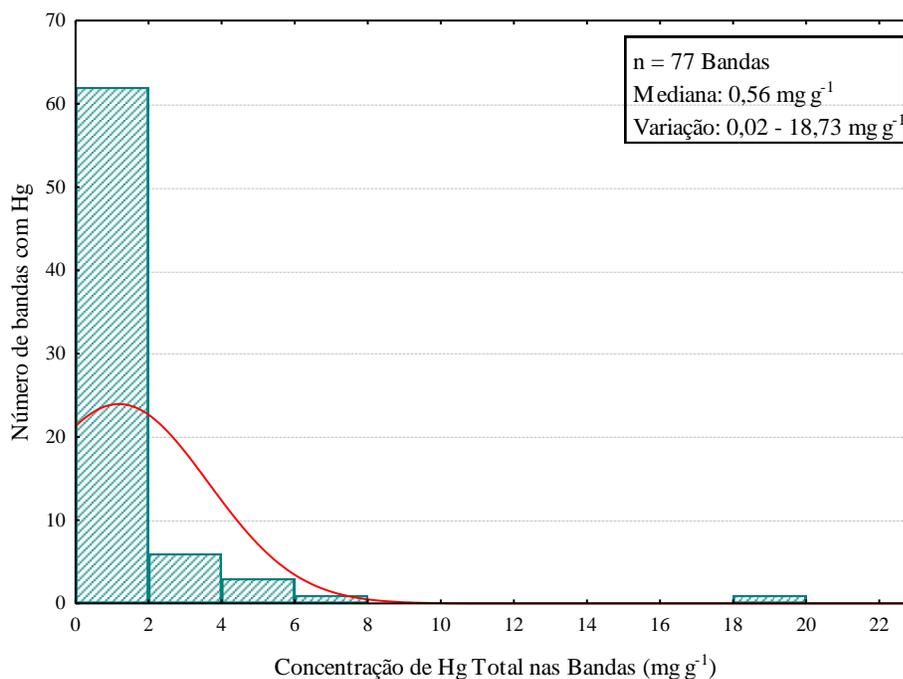
Lactante	Banda proteica	Massa molar (kDa)	Massa de proteína (μg)*	Concentração de Hg (mg g^{-1})**
9	28	28,20	9,38	0,09
9	30	30,82	1,47	0,74

*massa de proteína determinada utilizando o programa ImageQuant™ TL 8.1.

**mg de mercúrio por g de proteína da banda proteica.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 12**, observa-se que maior parte das bandas com presença de Hg, cerca de 72%, apresentaram concentrações de HgT inferiores a $1,0 \text{ mg g}^{-1}$, apenas 12% apresentaram concentrações entre $1,0$ e $2,0 \text{ mg g}^{-1}$, e 13% entre $2,1$ e $4,9 \text{ mg g}^{-1}$. Somente duas bandas apresentaram valores acima de 4 mg g^{-1} , sendo estas com massa molar abaixo de 15 kDa (**Figura 16**).

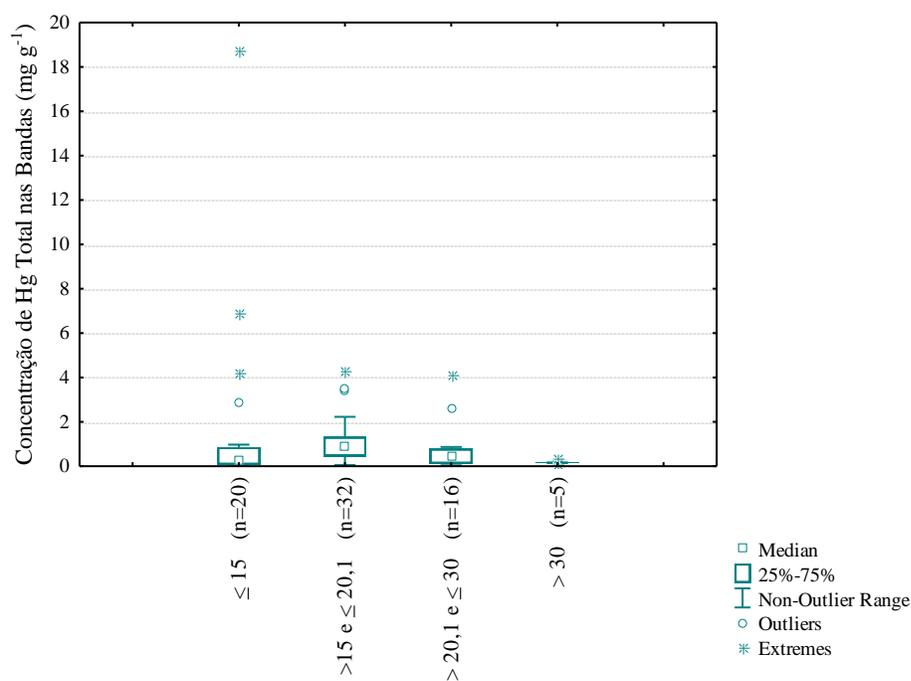
Figura 16 – Distribuição das concentrações de HgT (mg g^{-1}) nas bandas proteicas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.



Observa-se também, que maior parte do Hg está ligada às proteínas de bandas proteicas com massa molar menor que $20,1 \text{ kDa}$, representando cerca de 85% do HgT presente nas bandas. Destes 85% de HgT, cerca de 48% está em bandas com massa molar igual ou menor que 15 kDa e 52% em bandas com massa molar entre $15,1$ e $20,1 \text{ kDa}$ (**Figura 17**). Apesar da maior porção

de HgT estar na faixa de 15 a 20,1 kDa (52 de 85% do total de Hg), as maiores concentrações são observadas nas bandas com massa molar menor que 15 kDa (**Figura 17**). Além disso, com exceção da amostra 5, todas apresentaram Hg nas bandas de massa molar entre 14 e 15 kDa ($14 > 15$ kDa), sendo essa região promissora para identificação possíveis biomarcadores de Hg, tendo em vista a maior afinidade do mercúrio por proteínas de baixa massa molar (YOSHIDA et al., 1987).

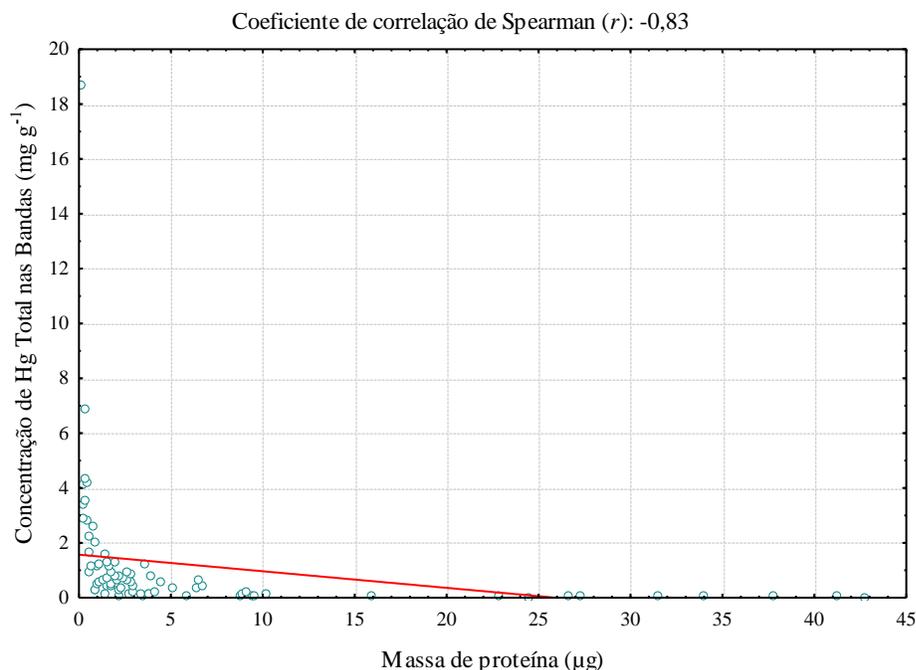
Figura 17 – Distribuição das concentrações de Hg total (mg g^{-1}) em bandas protéicas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia, estratificadas por faixas de massa molar (≤ 15 ; $< 15 \leq 20.1$; > 20.1 ; e ≤ 30 ; > 30 kDa).



O gráfico de dispersão da concentração de HgT em função da massa de proteína (**Figura 18**), indica que bandas com maior massa proteica possuem menor concentração de HgT, sendo que a maior porção (87%) das bandas que apresentaram Hg, possuem baixa massa de proteína, entre 0,09 e 10 μg , representando cerca de 99% de todo o Hg presente nas bandas, apenas 3% possuem massa entre 11 e 25 μg de proteína e 8% entre 26 e 45 μg de proteína, representando juntas 1% do Hg presente nas bandas. O teste não paramétrico de correlação de Spearman foi feito para avaliar a correlação entre as concentrações de HgT nas bandas e as massas de proteínas nas mesmas, sendo observado correlação fortemente negativa ($r = -0,83$; $p = 0,0001$), isso porque

as concentrações de mercúrio foram obtidas considerando as massas de proteínas em cada bandas analisada.

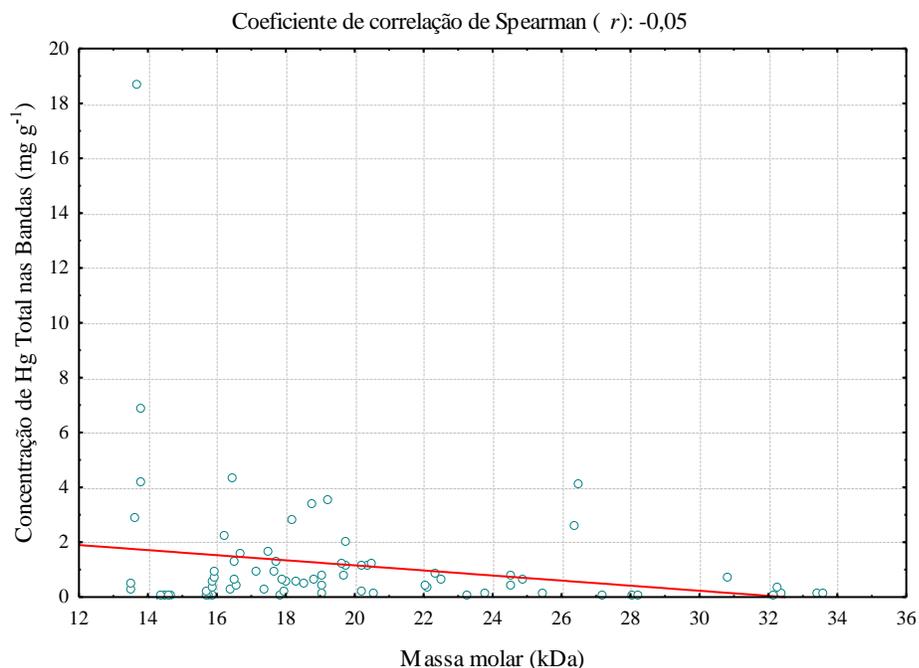
Figura 18 – Dispersão da concentração de HgT (mg g^{-1}) em função da massa de proteína (μg) das bandas proteínicas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.



As maiores massas de proteína encontram-se em bandas no intervalo de 14 a 15 kDa, seguido do intervalo de 22,02 a 28,5 kDa. Enquanto que as maiores concentrações de HgT encontram-se em bandas de massa molar menor que 15,5 kDa, seguido pelo intervalo de 16 a 20,1 kDa e de 26 a 27 kDa (**Figura 19**).

Apesar das tendências observadas, não foi encontrada correlação significativa entre as concentrações de HgT e a massa molar ($r = 0,05$; $p > 0,05$). Entretanto, uma tendência bastante relevante neste estudo, foi a presença de elevadas concentrações de HgT em bandas com massa molar abaixo de 15 kDa, além da presença deste metal nesta faixa molar para quase todas as amostras, o que pode ser um forte indicativo da presença de proteínas biomarcadoras de Hg, corroborando com estudos que têm mostrado que o mercúrio apresenta maior afinidade por proteínas de baixa massa molar, como as metalotioneínas (abaixo de 10 kDa) (YOSHIDA et al., 1987; YOSHIDA et al., 2002).

Figura 19 – Dispersão da concentração de HgT (mg g^{-1}) em função da massa molar (kDa) das bandas proteínicas obtidas por SDS-PAGE para amostras de leite de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia.



Devido a seu alto teor de cisteínas (aminoácidos que contém grupos sulfidríla, base mole), as metalotioneínas (MTs) tem alta afinidade por íons metálicos, sejam eles essenciais, como cobre e zinco, ou tóxicos, como mercúrio. A presença desses metais no organismo pode induzir a síntese dessa proteína, que atua como agente de desintoxicação (PEIXOTO et al., 2007; TANG et al., 2015). Dessa forma, as MTs têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores de exposição a metais pesados (TANG et al., 2015).

Lu e colaboradores (2005) observaram que a concentração de metais pesados no organismo está correlacionada ao nível de MT no sangue e na urina. Yoshida et al. (1987), em estudo com cobaias grávidas, verificaram que o Hg^0 transferido pela placenta e oxidado no fígado do feto está ligado a MTs. Em estudo mais recente, Yoshida e colaboradores (2002) observaram que a presença de MTs na placenta de ratas grávidas protege contra a transferência de Hg para o feto, desempenhando papel defensivo contra a intoxicação por Hg.

No presente estudo, foi encontrado Hg, principalmente, em proteínas de baixa massa molar (abaixo de 20,1 kDa), contudo, o padrão utilizado não possibilitou a análise de proteínas abaixo de 14,4 kDa, para possível identificação de MTs. Além disso, até o presente momento,

não foi feita a caracterização das proteínas das bandas nas quais foi identificada a presença de Hg. Dessa forma, mais estudos devem ser conduzidos nesta linha, para que se tenha melhor compreensão sobre os mecanismos de transferência de mercúrio para recém-nascidos, tendo em vista que crianças fazem parte de um grupo mais vulnerável no que se refere aos efeitos neurotóxicos deste metal, merecendo maior atenção em programas de biomonitoramento.

6. CONCLUSÕES

As análises utilizadas na determinação de HgT em cabelo, leite humano e bandas proteicas se mostraram eficientes. O procedimento de digestão ácida possibilitou completa mineralização das amostras de leite, bem como das bandas proteicas, permitindo a determinação de HgT nestas matrizes por GFAAS.

As concentrações de HgT nas amostras de cabelo das 9 lactantes foram abaixo do limite preconizado pela Organização Mundial da Saúde, bem como da média para a população amazônica, possivelmente devido ao baixo consumo de peixe pela população. A ingestão de Hg pelo consumo de leite materno, considerado o peso corpóreo de 4 kg e o volume médio consumido de 150 g de leite humano/kg de peso corpóreo, foi acima do limite tolerável (PTWI) para 8 das 9 amostras de leite analisadas, contudo, as concentrações foram condizentes com os resultados para região amazônica. Dessa forma, ao considerar os riscos e benefícios da amamentação nestes casos, os benefícios superam a presença de Hg.

Na etapa de fracionamento das proteínas do leite humano, foi necessária a otimização do método. Para tanto, determinou-se a quantidade de massa de proteína a ser aplicada no gel, 60 µg de proteína para cada amostra. Esta quantidade apresentou a melhor separação em comparação com as demais testadas para as amostras analisadas. No preparo das amostras verificou-se que a melhor forma de obtenção do extrato proteico se deu por meio de centrifugação.

Os géis obtidos apresentaram alta diversidade de bandas proteicas, em média $33 \pm 2,8$ bandas por amostra, apresentando boa repetibilidade, testada por meio de análise não paramétrica Mann-Whitney, onde se inferiu pela semelhança entre as repetições dos géis. Além disso, observou-se homogeneidade quanto à distribuição das proteínas nos géis possibilitando uma delimitação das bandas de forma mais clara e concisa.

No mapeamento de HgT nas bandas proteicas obtidas pelo fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, observou-se que maior parte do mercúrio e as maiores concentrações se

concentraram em proteínas de baixa massa molar, além de quase todas as amostras apresentarem mercúrio na região entre 14 e 15 kDa. Estes resultados podem indicar que proteínas com menor massa molar têm maior probabilidade de apresentarem mercúrio. Assim, proteínas de baixa massa molar são fortes candidatas a biomarcadoras de mercúrio, contudo, mais estudos são necessários para que se tenham maiores conclusões.

REFERÊNCIAS

- AL-SALEH, I.; ABDULJABBAR, M.; AL-ROUQI, R.; ELKHATIB, R.; ALSHABBAHEEN, A.; E SHINWARI, N. Mercury (Hg) Exposure in Breast-Fed Infants and Their Mothers and the Evidence of Oxidative Stress. **Biological Trace Element Research**, v. 153, n. 1-3, p. 145–154, jun. 2013.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2003.
- AMORIM, MIM; MERGLER, D; BAHIA, MO; DUBEAU, H; MIRANDA, DC; LEBEL, J; BURBANO, RR; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. – Brasília: **Anvisa**, 160 p., 2008.
- ARTAXO, P.; CAMPOS, R. C.; FERNANDES, E. T.; MARTINS, J. V.; XIÃO, Z.; LINDQVIST, O.; FERNAHNDEZ-JIMEHNEZ, M.; MAENHAUT, W.. Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon basin. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 24 p. 4085-4096, 2000.
- BAEUML, J.; BOSE-O'REILLY, S; LETTMEIER, B.; MAYDL, A.; MESSERER, K.; ROIDER, G.; DRASCH, G.; SIEBERT, U. Applicability of two mobile analysers for mercury in urine in small-scale gold mining areas. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 1, p. 64– 67, dez. 2011.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, fev. 2013.

BARBIERI, F. L.; GARDON, J. Hair mercury levels in Amazonian populations: spatial distribution and trends. **International Journal of Health Geographics**, 2009, v. 8, p. 1-20, dez. 2009.

BARBOSA, A.C., SOUZA, J.R., GARCIA, M.A. Mercury contamination in hair of riverine populations of Apiaç's Reserve in the Brazilian Amazon. **Water Air Soil Pollut**, n. 97, p. 1–8, 1997.

BARBOSA, A. C.; DÓREA, J. G. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 71–79, out. 1998.

BARNES, D. B.; PIERCE, G. F.; LICHTI, D.; LANDT, M.; KOENIG, J.; CHAN, K.-M. Effects of dextran on five biuret-based procedures for total protein in serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, n.12, p. 2018-2019, dez. 1985.

BASTOS, W. R.; REBELO, M. F.; FONSECA, M. F.; ALMEIDA, R.; MALM, O. A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Acta Amazônica**. v. 38, n. 3, p. 431 – 438, 2008.

BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: Uma breve revisão. **Geochim. Brasil**. v. 18, n. 2, p. 99-114, 2004.

BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; DÓREA, J. G.; BARBOSA, A. C. Annual flooding and fish-mercury bioaccumulation in the environmentally impacted Rio Madeira (Amazon). **Ecotoxicology**, v. 16, n.16, p. 341–346, abr. 2007.

BASU, N., TUTINO, R., ZHANG, Z., CANTONWINE, D. E.; GOODRICH, J. M.; SOMERS, E. C.; RODRIGUEZ, L.; SCHNAAS, L.; SOLANO, M.; MERCADO, A.; PETERSON, K.; SÁNCHEZ, B. N.; HERNÁNDEZ-AVILA, M.; HU, H.; TÉLLEZ-ROJO, M. M. Mercury levels in pregnant women, children, and seafood from Mexico City. **Environmental Research**, v. 135, p. 63–69, nov. 2014.

BEHROOZ, R. D.; ESMAILI-SARI, A.; PAR, F. E.; AMINI, M. Mercury Concentration in the Breast Milk of Iranian Women. **Biological Trace Element Research**, v. 147, n. 1-3, p. 36-43, jun. 2012.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, v. 71, n. 1 p. 138–149, set. 2005.

BERG, J. M.; TYMOCKZO, J. L.; STYER, L. **Bioquímica**. 5ª ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara e Koogan, 2004.

BIANCONI, A.; GOVONE, J. S.; ZUBEN, C. J. V.; PIÃO, A. C. S.; PIZANO, M. A.; ALBERTI, L. F. Transformação de dados e implicações da utilização do teste de Kruskal-Wallis em pesquisas agroecológicas. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba**, v. 18, p. 27-34, jan.-dez. 2008.

BIRCH, R. J.; BIGLER, J.; ROGERS, J. W.; ZHUANG, Y.; CLICKNER, R. P. Trends in blood mercury concentrations and fish consumption among U.S. women of reproductive age, NHANES, 1999–2010. **Environmental Research**, v. 133, p. 431–438, ago. 2014.

BISINOT, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BIYOUKUTE. **Proteinlerin Elektroforetik Saflastirilmesi**. 2014. Disponível em: <<http://biyokure.org/proteinlerin-elektroforetik-saflastirilmesi-6/7419/sds-page/>>. Acesso em 8 de novembro de 2014.

BJÖRNBERG, K. A.; VAHTER, M.; BERGLUNG, B.; NIKLASSON, B.; BLENNOW, M.; ENGLUNG, G. S. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. **Environmental Health Perspect**, v. 113, n. 10, p. 1381–1385, out. 2005.

BOISCHIO, A. A. P. & BARBOSA, A. Exposure to Organic Mercury in Riparian Populations on the Upper Madeira River, Rondonia, Brazil, 1991: Preliminary Results. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 9, n. 2, p. 155-160, abr/jun, 1993.

BOISCHIO, A. A. P.; CERNICHIARI, E.; HENSHEL, D. Segmental hair mercury evaluation of a single family along the Upper Madeira Basin, Brazilian Amazon. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 16, n. 3, p. 681-686, jul-set, 2000.

BOSE-O'REILLY, S.; LETTMEIER, B.; ROIDER, G.; SIEBERT, U.; DRASCH, G. Mercury as a serious health hazard for children in gold mining areas **Internation Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n.1, p. 615–623, mai. 2008.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri – SP: Manole, 2003.

BRASIL, MME, (Ministério das Minas e Energia). **Plano Decenal de Expansão de Energia 2020**, vol. 2. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Brasília, DF, Brasil. Disponível em: <[http:// www.epe.gov.br/PDEE/20111229_1.pdf](http://www.epe.gov.br/PDEE/20111229_1.pdf)>.

BRASIL, MME, (Ministério das Minas e Energia). **Plano Decenal de Expansão de Energia 2021**. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Brasília, DF, Brasil. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/PDEE/20120924_1.pdf>.

BREWIS, I. A.; BRENNAN, P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 80, p. 1-44, 2010.

CHIEN, L-C.; HAN, B-C.; HSU, C-S.; JIANG, C-B.; YOU, H-J.; SHIEH, M-J.; YEH, C-Y. Analysis of the health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. **Chemosphere**, v. 64, p. 79–85, 2006.

CUTLER, P.; HEALD, G.; WHITE, I.R.; RUAN, J. A novel approach to spot detection for two-dimensional gel electrophoresis images using pixel value collection. **Proteomics**, v.3, n.4 p.392-401, abr. 2003.

CUNHA, L. R; COSTA, T. H. M., e CALDAS, E. D. Mercury Concentration in Breast Milk and Infant Exposure Assessment During the First 90 Days of Lactation in a Midwestern Region of Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 151, n. 1 p. 30–37, jan. 2013.

DA COSTA, S. L.; MALM, O.; DÓREA, J. G. Breast-Milk Mercury Concentrations and Amalgam Surface in Mothers from Brasília, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 106, p. 145-151, 2005.

DÓREA, J. G. Mercury and lead during breast-feeding. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n.1, p. 21–40, jul. 2004.

DÓREA, J. G.; DE SOUZA, J. R.; RODRIGUES, P.; FERRARI, I.; BARBOSA, A. C. Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Munduruku and Kayabi Indians of Amazonia. **Environmental Research**, v. 97, n. 2 ,p. 209-219, fev. 2005.

DÓREA, J. G. & DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 369–376, jun. 2006.

DÓREA, J. G.; BEZERRA, V. L. V. A.; FAJON, V.; HORVAT, M. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17-18, p. 1563–1566, ago. 2011.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700–711, fev. 2013.

DRASCH, G.; AIGNER, S.; ROIDER, G.; STAIGER, F.; LIPOWSKY, G. Mercury in Human Colostrum and Early Breast Milk. Its Dependence on Dental Amalgam and other Factors. **Journal of Trace Elements in Medicine Biology**, v. 12, p. 23 -27, 1998. Drexler e Schaller, 1998

DUNBAR, B.S. **Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques**. New York: Plenum Press, 1987.

EIA/RIMA, Aproveitamentos Hidrelétricos Santo Antônio e Jirau, Rio Madeira. 2005

ESBR – Energia Sustentável do Brasil. **Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico da Usina Hidrelétrica (UHE) Jirau**. Disponível em: <http://sig.esbrsig.com.br/jirau_2011/> Acesso em 6 de janeiro de 2015.

ESTEBAN, M. & CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 438–449, fev. 2009.

FADINI, P. S. & JARDIM, W. F. Is the Negro River Basin Amazon/ impacted by naturally occurring mercury? **The Science of the Total Environment**, v. 275, n. 1 p. 71-82, jul. 2001.

FAIAL, K.; DEUS, R.; DEUS, S.; NEVES, R.; JESUS, I.; SANTOS, E.; ALVES, C. N.; BRASIL, D. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.10.009>>. Acesso em 11 de novembro de 2014.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). **Evaluation of mercury, lead, cadmium and the food additives amaranth, diethylpyrocarbamate, and octyl gallate.** World Health Organization, Geneva. WHO Food Additives Series, 4, p. 605-683, 1972.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). **Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Methylmercury.** WHO Food Additives Series, 52, p. 565-623, 2004.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). **Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Methylmercury.** WHO Food Additives Series, 63, p. 605-684, 2011.

FARIA, M. A. M. Mercuralismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 116-27, 2003.

FARINA, F.; AVILA, D. S.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and Mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 575-594, abr. 2013.

FEARNSIDE, P. M. Impacts of Brazil's Madeira River Dams: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. **Environmental Science e Policy**, v. 38, p. 164 – 172, 2014.

FLACK, C. P.; WOOLLEN, J. W. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 559-561, abr. 1984.

GALVÃO, R. C. F.; BERNARDI, J. V. E.; DÓREA, J. G.; BARBOSA, A. C; BASTOS, W. R.; MANZATTO, A. G.; LANDIM, P. M. B. Uso de krigagem indicativa para verificação da distribuição de Mercúrio Total em sedimentos de fundo no Alto Rio Madeira. **In:** I Conferência Programa Piloto para a Proteção das Florestas Tropicais - PPG7 Subprograma de Ciência e Tecnologia – SPC&T - Fase II, 2008, Belém. **Anais...** Belém: PPG7, SPC&T - Fase II, 2008.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 1-15, mar. 2006.

GARCÍA-ESQUINAS, E.; PÉREZ-GÓMEZ, B.; FERNÁNDEZ-NAVARRO, P.; FERNÁNDEZ, M. A.; PAZ, C.; PÉREZ-MEIXEIRA, A. M.; GIL, E.; IRISO, A.; SANZ, J. C.; ASTRAY, J.; CISNEROS, M.; SANTOS, A.; ASENSIO, A.; GARCÍA-SAGREDO, J. M.; GARCÍA, J. F.;

VIOQUE, J.; LÓPEZ-ABENTE, G.; POLLÁN, M.; GONZÁLEZ, M. J.; MARTÍNEZ, M.; ARAGONÉS, N. Lead, 85anadia and cádmium in umbilical cord blood and its association with parental epidemiological variables and birth factors. **BMC Public Health**, 13: 841, p. 1-11, set. 2013.

GÓMEZ-ARIZA, J.L.; GARCÍA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M. J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metalloomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1-2, p. 15–22, out. 2004.

GOUDARZI, M. A.; PARSAEI, P.; NAYEBPOUR, F.; RAHIMI, E. Determination of mercury, cadmium and lead in human milk in Iran. **Toxicology and Industrial Health**, p. 1-4, abr. 2012.

GREENWOOD, M. R.; CLARKSON, T. W.; DOHERTY, R. A.; GATES, A. H.; AMIN-ZAKI, L.; ELHASSANI, S.; MAJEED, M. A. Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. **Environmental Research**, v. 16, p. 48–54, 1978.

GRIMALDI, C.; GRIMALDI, M.; GUEDRON, S. Mercury distribution in tropical soil profiles related to origin of mercury and soil processes. **Science of the Total Environment**, v. 4 n. 1, p. 121–129, ago. 2008.

GUIMARÃES, R. M. & ASMOS, C. I. R. F. Por que uma saúde ambiental infantil? Avaliação da vulnerabilidade de crianças a contaminantes ambientais. **Pediatria, São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 239-245, 2010.

HACON, S.; BARROCAS, P. R. G.; VASCONCELLOS, A. C. S.; BARCELLOS, C., WASSERMAN, J. C.; CAMPOS, R. C.; RIBEIRO, C., AZEVEDO-CARLONI, F. B. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 24 n. 7, p. 1479-1492, jul. 2008.

HAENEN, S.; CLYNEN, E.; NEMERY, B.; HOET, P. H. M.; VANOIRBEEK, J. A. J. Biomarker discovery in asthma and COPD: Application of proteomics techniques in human and mice. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 101–112, set. 2014.

HUGUET, L.; CASTELLE, S.; SCHAFER, J.; BLANC, G.; MAURY-BRACHET, R.; REYNOUARD, C., JORAND, F. Mercury methylation rates of biofilm and plankton

microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1338–1348, 2010.

JAKAITIS, B. M.; DENNING, P. W. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. **Clinics Perinatol**, v. 41, n. 2, p. 423–435, jun. 2014.

JANICKA, M.; BINKOWSKI, Ł. J.; BŁASZCZYK, M.; PALUCH, J.; WOJTÁS, W.; MASSANYI, P.; STAWARZ, R. Cadmium, lead and mercury concentrations and their influence on morphological parameters in blood donors from different age groups from southern Poland. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 342–346, jan. 2015.

JARDIM, A. N. O & CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JIMÉNEZ, M. R.; KUHN, G. R.. **Toxicología Fundamental**. 4ª. ed. Barcelona: Diaz de Santos, 2009.

JUÁRES, F., J.; SÁNCHEZ, A. R. R.; RICO, R. **Toxicologia ambiental**. 4ª ef. UAA, 2009.

KALISH, B. T.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; WRIGHT, R. O.; AMARASIRIWARDENA, C. J.; JAYAWARDENE, I.; GILLMAN, M. W.; LIPSHULTZ, S. E.; OKEN, E. Associations of prenatal maternal blood mercury concentrations with early and mid-childhood blood pressure: A prospective study. **Environmental Research**, v. 133, p. 327–333, ago. 2014.

KHOURY, E. D. T.; SOUZA, G. S.; SILVEIRA, L. C. L.; COSTA, C. A.; ARAÚJO, A. A.; PINHEIRO, M. C. N. Manifestações neurológicas em ribeirinhos de áreas expostas ao mercúrio na Amazônia brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, n. 11, p. 2307-2318, nov, 2013.

KIM, D.H.; KIM, J.H.; SEO, J.H.; LEE, J.W.; LIM, S.Y.; LEE, H.J.; BYUN, M.W. Polymerization of SDS-PAGE gel by gamma irradiation and its use for characterization by electrophoresis of a protein. **Radiation Physics and Chemistry**, v.74, n.5, pp. 395–398, dez. 2005.

KONDO, T.; KAWAI, A. A proteomics approach for the development of sarcoma biomarkers. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 121-128, set. 2014.

KOZIKOWSKA, I.; BINKOWSKI, L. J.; SZCZEPANSKA, K.; SLAWSKA, H.; MISZCZUK, K.; SLIWINSKA, M.; LACIAK, T.; STAWARZ, R. Mercury concentrations in human placenta, umbilical cord, cord blood and amniotic fluid and their relations with body parameters of newborns **Environmental Pollution**, v. 182, p. 256-262, nov. 2013.

LACERDA, L. D. & MALM, O. Mercury contamination In aquatic ecosystems: an analysis of the critical areas. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LACERDA, L. D. Global mercury emissions from gold and silver mining. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 97, p. 209-221, 1997.

LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**, v.6 p.60-66, ago.-set. 2003.

LAURINDO, V.M; CALIL, T.; LEONE, C.R.; RAMOS, J.L.A. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Pediatria**, São Paulo, v.14, p.14-23, 1992.

LICKER, V.; BURKHARD, P. R. Proteomics as a new paradigm to tackle Parkinson's disease research challenges. *Transl Proteomics*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trprot.2014.08.001>. Acesso em: 17 de setembro de 2014.

LIMA, E. R. Z.; COLON, J. C.; DE SOUZA, M. T. Alterações auditivas em trabalhadores expostos a mercúrio. **Revista CEFAC, São Paulo**, 2009.

LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. O. A.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 1052–1056, ago. 2010.

LONNERDAL, B; FORSUM, E. Casein content of human milk. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v.41, n.1, p. 113-120, jan. 1985.

LOPES, M. M.; BRANCO, V. T. F. C.; SOARES, J. B. Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. **Transportes**, v. 21, n. 1, p. 59–66, jun. 2013.

LU, J.; JIN, T.; NORDBERG, G.; NORDBERG, M. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 150–156, ago. 2005.

MAILMAN, M.; STEPNUK, L.; CICEK, N.; BODALY, R.A. Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 224-235, 2006.

MANDAL, S. M.; BHARTI, R.; PORTO, W. F.; GAURI, S. S.; MANDAL, M.; FRANCO, O. L.; GHOSH, A. K. Identification of multifunctional peptides from human milk. **Peptides**, v. 56, p. 84–93, jun. 2014.

MANSO, M. A.; LÉONIL, J.; JAN, G.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International dairy journal**, v.15, n.6, p.845-855, jun-set. 2005.

MARGULIS, S. **Causes of Deforestation in the Brazilian Amazon**. World Bank, Washington, DC. 2004.

MARQUES, R. C.; DÓREA, J. G.; BASTOS, W. R.; REBELO, M. F.; FONSECA, M. F.; MALM, O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 210, n. 1, p. 51–60, fev. 2007.

MARQUES, R. C.; DÓREA, J.; MCMANUS, C.; LEÃO, R. S.; BRANDÃO, K. G.; MARQUES, R. C.; VIEIRA, I. H.; GUMARÃES, J-R. D.; MALM, O. Hydroelectric reservoir inundation (Rio Madeira Basin, Amazon) and changes in traditional lifestyle: impact on growth and neurodevelopment of pre-school children. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 661-669, abr. 2010.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, L. M.; OLIVARES, M.; BOZA, J.; JIMÉNEZ, J.; FERNÁNDEZ, L.; XAUS, J.; E RODRIGUEZ, J. M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 121–127, 2004.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, fev. 2000.

MINISTRY FOR THE ENVIRONMENT/MANATU MO TE TAIAO. **Mercury Inventory for New Zealand**. Ago. 2009.

MOLINA-VILLALBA, I.; LACASAÑA, M.; RODRÍGUEZ-BARRANCO, M.; HERNÁNDEZ, M. F.; GONZALEZ-ALZAGA, B.; AGUILAR-GARDUÑO, C.; GIL, F. Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas. **Chemosphere**, v. 124, p. 83–91, abr. 2015.

MORAES, P.M.; SANTOS, F.A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C.C.F.; VIEIRA, J.C.S; ROLDAN, P.S.; PADILHA, P.M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*, v. 141, n.3, p. 2614-2617, dez.2013.

MORAES, P.M., **Fracionamento de mercúrio em amostras de tecido muscular de peixes coletados na área de influência do “AHE Jirau” – bacia do rio madeira Utilizando estratégias metaloproteômicas**. 2014. 123 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, São Paulo, 2014.

MORTENSEN, M. E.; CAUDILL, S. P. ; CALDWELL, K. L. WARD, C. D.; JONES, R. L. Total and methylmercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011–2012. **Environmental Research**, v. 134, p. 257–264, out. 2014.

NAIADS. **Airplanes vs. Fish: Boeing Seeks Special Laws to Pollute**. Nov. 2013. Disponível em: <https://naiads.wordpress.com/2013/11/06/airplanes-vs-fish-boeing-seeks-special-laws-to-pollute/> Acesso em: 8 de novembro de 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3ª ed., São Paulo: Sarvier, 2002.

ORTNER, H.M.; BULSKA, E.; ROHR, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUCH, S.; WELZ, B. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review). **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, n.12, p. 1835–1853, dez. 2002.

ÖRÜN, E.; YALÇIN, S. S.; AYKUT, O.; ORHAN, G.; KOÇ-MORGIL, G.; YURDAKÖK, K.; UZUN, R. Mercury exposure via breast-milk in infants from a suburban area of Ankara, Turkey. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 54, n. 2 p. 136-143, mar.-abr. 2012.

OSKARSSON, A.; SCHÜLTZ, A.; SKERFVING, S.; HALLÉN, I. P.; OHLIN, B.; LAGERKVIST, B. J. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. **Arch Environ Health**, v. 51, n.3, p. 234–241, mai-jun. 1996.

PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D. Exposição humana ao mercúrio e efeitos adversos à saúde na Amazônia: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. S503-S520, 2008.

PATEL, S. Chapter Three – Role of Proteomics in Biomarker Discovery: Prognosis and Diagnosis of Neuropsychiatric Disorders. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 97, p. 39-75, 2014.

PEIXOTO, N. C.; SERAFIM, M. A.; FLORES, E. M. M.; BEBIANNO, M. J.; PEREIRA, M. E. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Life Sciences**, v. 81, n.16, p. 1264–1271, set, 2007.

PETERS, M.D.P.; SILVEIRA, I.D.B.; PEGORARO, C.; PEDROSO, C.E.S.; LOURENÇO, L.A.; CASAGRANDE, M. Perfil eletroforético qualitativo das proteínas do leite de vacas submetidas a manejo aversivo. **Revista Thema**. v.9, n.1, p.1-6, 2012.

PINHEIRO, M.C., MULLER, R.C., SARKIS, J.E., VIEIRA, J.L., OIKAWA, T., GOMES, M.S., GUIMARÃES, G.A., DO NASCIMENTO, J.L., SILVEIRA, L.C. Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. **Science of the Total Environ**, v. 349, n. 1-5, p. 284–288, out. 2005.

PINHEIRO, M. C. N.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; VIEIRA, J. L. F.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G. A.; ARAÚJO, C. C.; AMORAS, W. W.; RIBEIRO, D. R.; HERCULANO, A. M.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; SILVEIRA, L. C. L. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environment International**, v. 33, n. 1, p. 56–61, jan. 2007.

PIRARD, C.; KOPPEN, G.; DE CREMER, K.; OVERMEIRE, I. V.; GOVARTS, E.; DEWOLF, M. C.; DE MIEROOP, E. V.; AERTS, D.; BIOT, P.; CASTELEYN, L.; KOLOSSA-GEHRING, M.; SCHWEDLER, G.; ANGERER, J.; KOCH, H. M.; SCHINDLER, B. K.; CASTAÑO, A.; ESTEBAN, M.; SCHOETERS, G.; HOND, E. D.; SEPAI, O.; EXLEY, K.; HORVAT, M.; BLOEMEN, L.; KNUDSEN, L. E.; JOAS, R.; JOAS, A.; LOCO, J. V.; CHARLIER, C. Hair mercury and urinary cadmium levels in Belgian children and their mothers within the framework of the COPHES/DEMOCOPHES projects. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 730–740, fev. 2014.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 167–177, jan. 2014.

POZZI, C. M. C.; BRAGA, C. P.; VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z.; GOZZO, F. C.; PADILHA, P. M. Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach. **Food Chemistry**, v. 166, p. 492-497, jan. 2015.

RAIMONDO, R.F.S.; MIYASHIRO, S.I.; MORI, C.S.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Proteínas do soro lácteo de vacas da raça Jersey durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.119-125, jan. 2013.

RIBEIRO, C. A. O.; NATHALIE, M. D.; GONZALEZ, P.; YANNICK, D.; JEAN-PAUL, B.; BOUDOU, A.; MASSABUAU, J. C. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 304–309, 2008.

REIS, G. M.; RIBEIRO JUNIOR, J. I. Comparação de testes paramétricos e não paramétricos aplicados em delineamentos experimentais. **In:** Anais do III Simpósio Acadêmico de Engenharia de Produção – III SAEPRO, 2007. Disponível em:
<<http://www.mat.ufrgs.br/~viali/estatistica/mat2282/material/textos/SA03.pdf>> Acesso em: 7 de novembro de 2014.

ROCHA, A. V.; CARDOSO, B. R.; COMINETTI, C.; BUENO, R. B.; DE BORTOLI, M. C.; FARIAS, L. A.; FAVARO, D. I. T.; CAMARGO, L. M. A.; COZZOLINO, S. M. F. Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondônia, Amazônia. **Nutrition**, v. 30, n.11-12, p. 1318–1323, nov./dez. 2014.

ROTILIO, D.; CORTE, A. D.; D'IMPERIO, M.; COLETTA, W.; MARCONE, S.; SILVESTRI, C.; GIORDANO, L.; DI MICHELE, M.; DONATI, M. B. Proteomics: Bases for protein complexity understanding. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 3, p. 257-262, mar. 2012.

ROULET, M., LUCOTTE, M., SAINT-AUBIN, A., TRAN I., S., RHEAULT, I. FARELLA, N., SILVA, E.J., DEZENCOURT, J., PASSOS, C.J.S., SOARES, G.S., GUIMARÃES, J.R.D., MERGIER, D., AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soil developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. **The Science of Total Environment**, v. 223, n. 1, p. 1-24, nov. 1998.

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; AKAGI, H. Declining Minamata Male Birth Ratio Associated with Increased Male Fetal Death Due to Heavy Methylmercury Pollution. **Environmental Research Section A**, v. 87, p. 92-98, 2001.

SANTOS-FRANCÉS, F.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; ALONSO-ROJO, P.; CONTRERAS, F.; ADAMS, M. Distribution and mobility of mercury in soils of a gold mining region, Cuyuni river basin, Venezuela. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1268-1276, abr. 2011.

SAUER, S. **Terra e modernidade: a reinvenção do campo brasileiro**. São Paulo, Expressão Popular, 139-171, 2010.

SAUER, S. & BALESTRO, M. W. (org). **Agroecologia e os desafios da transição agroecológica**. São Paulo, Expressão Popular, 2009.

SHI, W; CHANCE, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SIQUEIRA, G. W. & APRILE, F. M. Distribuição de mercúrio total em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica – Brasil. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 2, p. 259-268, 2012.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. **Methods in Enzymology**, v. 402, p. 245–289, 2005.

SOUZA, A. C. C. Assessment and statistics of Brazilian hydroelectric power plants: Dam areas versus installed and firm power. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 12: 1843-1863, 2008.

STRAATEN, P. V. Human exposure to mercury due to small scale gold mining in northern Tanzania. **The Science of the Total Environment**, v. 259, n. 1-3 p. 45-53, out. 2000.

STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. **Methods in Enzymology**, v. 402, p. 245-289, 2005.

SUNDBERG, J.; JONSSON, S.; KARLSSON, M. O.; OSKARSSON, A. Lactational Exposure and Neonatal Kinetics of Methylmercury and Inorganic Mercury in Mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, n. 2 p. 160–169, jan. 1999.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 4, p. 215-226, out. 2012.

TANG, X.; WANG, Y. S.; XUE, J. H.; ZHOU, B.; CAO, J. X.; CHEN, S. H.; LI, M. H.; WANG, X. F.; ZHU, Y. F.; HUANG, Y. Q. A novel strategy for dual-channel detection of metallothioneins and mercury based on the conformational switching of functional chimera aptamer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 258–264, mar. 2015.

THE MADISON DECLARATION ON MERCURY POLLUTION. In: CONFERENCE ON MERCURY AS A GLOBAL POLLUTANT. Madison. **Anais...** Madison: Royal Swedish Academy of Sciences, 2007.

TUNDISI, J. G. The exploitation of the hydroelectric potential of the Amazon region. **Estudos avançados**, v. 21, n. 59, p. 109-117, 2007.

UNEP. **Minamata Conveentionon Mercury**. 2013. Disponível em: <http://mercuryconvention.org> Acesso em: 08 de fevereiro de 2015.

VIEIRA, S. M; ALMEIDA, R.; HOLANDA, I. B. B.; MUSSY, M. H.; GALVÃO, R. C. F.; CRISPIM, P. T. B.; DÓREA, J. G. BASTOS, W. R. Total and methyl-mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the Rio Madeira, Amazon, Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 6, p. 682-689, nov. 2013.

WHITFORD, D., **Proteins: structure and function**. Chuchester: J. Wiley & Sons, 2005.

WHO - World Health Organization, Environmental Criteria 1: “Mercury - Environmental Aspects”. **W. H. O.**, Geneva, p 26, 86, 1989.

WRIGHT, P. C.; NOIREL, J.; OW, S.-Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738-765, mar. 2012.

YALÇIN SS, YURDAKÖK K, YALÇIN S, ENGÜR-KARASIMAV D, COŞKUN T. Maternal and environmental determinants of breast-milk mercury concentrations. **Turk J Ped.** v. 52, p. 1-9, 2010.

YANNONE, S. M.; HARTUNG, S.; MENON, A. L.; ADAMS, M. W. W.; TAINER, J. A. Metals in biology: defining metalloproteomes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 89-95, fev. 2012.

YOSHIDA, M., AOYAMA, H., SATOH, H., YAMAMURA, Y., Binding of mercury to metallothionein-like protein in fetal liver of the guinea pig following *in utero* exposure to mercury vapor. **Toxicology Letters**, v. 34, n. 1, p. 1–6, jun. 1987.

YOSHIDA, M.; SATOH, M.; SHIMADA, A.; YAMAMOTO, E.; YASUTAKE, A.; TOHYAMA, C. Maternal-to-fetus transfer of mercury in metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor. **Toxicology**, v. 175, n. 1-3, p. 215–222, jun. 2002.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V; LICHTIG, J., Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes, **Química Nova**, v.21 n.6, p.787-793, jun. 1998.

ZHANG, L. & WONG, M. H. Environmental mercury contamination in China: Sources and impacts. **Environment International**, v. 33, p. 108–121, 2007.

ZOLFAGHARI, G.; ESMAILI-SARI, A.; GHASEMPOURI, S. M.; FAGHIHZADEH, S. Evaluation of environmental and occupational exposure to mercury among Iranian dentists. **Science of the Total Environment**, v. 381, p. 59–67, 2007.

<http://www.mfe.govt.nz/publications/waste/mercury-inventory-new-zealand-2008/2-mercury-environment>
– Adaptado.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do Projeto: Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do Mercúrio (Hg) e de Riscos à Saúde Humana.

Coordenadores : Prof. Dr. Luiz Fabrício Zara, Coordenador Geral
Prof. Dr. Carlos J.S. Passos, Coordenador de Saúde Humana

Endereço dos pesquisadores responsáveis
Faculdade UnB Planaltina
Universidade de Brasília
Área Universitária 1, Vila N. Sra. de Fátima
73.300-0000, Planaltina - DF
Fones: 0xx61.3308.5185 / 1390
Fax: 0xx61.3389.2601 / 3466
Email: cjpassos@unb.br

Centro de Informações de Mutum
Rua da Pista, 159
Tel: (69) 3237-3067
Ligação Gratuita: 0800 647 7747

Voluntário N°: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar de um programa ambiental de monitoramento biológico, cujos detalhes são os seguintes:

1. A exposição (contato) de populações ribeirinhas ao mercúrio (Hg) na região amazônica, principalmente vinda do consumo de peixes, já é conhecida há muitos anos. Além do Hg utilizado nos garimpos de ouro e/ou presentes naturalmente nos solos da Amazônia, esta substância pode também se encontrar no meio ambiente de usinas hidrelétricas após o enchimento dos reservatórios. Assim, neste programa de monitoramento nós pretendemos avaliar a quantidade de Hg em diversas partes do ambiente da região da usina hidrelétrica, e também em amostras de cabelo da população local a fim de assegurarmos que não haverá problemas de saúde humana devido à exposição ao Hg.
2. Este programa envolve profissionais da empresa VENTURO CONSULTORIA AMBIENTAL, visando a condução do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau, sob coordenação geral do Prof. Dr. Luiz Fabricio Zara, da Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília.
3. Sua participação no programa se dará da seguinte maneira:

Será coletada amostra de leite pela própria em frascos de vidro fornecidos pelo pesquisador, sendo eu a voluntária será previamente instruída sobre como higienizar a mama antes da coleta. As amostras serão armazenadas em freezer doméstico em sua residência até a data do recolhimento pelo pesquisador que as transferirá para o Laboratório de análises, onde permaneceram congeladas a -25°C até a análise.

Também pedimos que você responda um questionário que abrange questões sobre: perfil sócio-demográfico, história médica ambiental e ocupacional, morbidade referida, fatores de risco de adoecimento, além de hábitos sociais, culturais e alimentares.

Por fim, solicitamos que você se submeta a uma consulta com o profissional médico integrante de nossa equipe a fim de que este possa avaliar seu estado geral de saúde, particularmente em relação à exposição ao Hg.

4. As medidas dos níveis de concentração de elementos traço e mercúrio serão realizadas pela Venturo Consultoria Ambiental, em parceria com o Instituto de Química de Araraquara, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Julio Cesar Rocha.
5. Os benefícios de sua participação neste programa serão a obtenção de informações sobre a quantidade de substâncias químicas (metais) presentes no seu corpo, o acesso a um profissional médico que lhe instruirá sobre os resultados dos exames e avaliará seu estado geral de saúde com os devidos encaminhamentos, além de orientações gerais de outros profissionais da equipe quanto à problemática geral da presença de Hg no meio ambiente.
6. Assumimos que você compreende que os dados obtidos neste programa podem ser publicados, à condição que seu nome ou identificação não sejam revelados. Para manter a confidencialidade de seus registros, nossa equipe manterá sua identidade em forma de número e seus dados serão guardados dentro de envelopes, aos quais somente membros da coordenação terão acesso.
7. Nossa equipe não provê qualquer remuneração por sua participação voluntária no programa. Quaisquer dúvidas que você tiver em relação ao programa ou à sua participação, antes ou depois do seu consentimento, serão respondidas pela empresa Venturo Consultoria Ambiental.

CONSENTIMENTO

Eu li as informações acima, recebi as explicações sobre a natureza, demanda, riscos e benefícios do programa. Assumo conscientemente os riscos envolvidos e compreendo que posso retirar meu consentimento e interromper minha participação a qualquer momento, sem penalidade ou perda de benefício.

Eu, _____, ao assinar o presente termo, estarei consentindo à utilização da amostra de cabelo para a análise de elementos traço (metais) e em específico mercúrio, cujas informações sejam, confidencialmente, utilizadas para fins do programa de monitoramento biológico que me foi apresentado.

Assinatura do (a) voluntário (a)

Data: ____/____/____

APÊNDICE B – Questionários

Coleta de Dados Sociodemográficos

1. **Data da Coleta:** __/__/__
2. **Idade:** _____
3. **Data de Nascimento (Mãe)** __/__/__
4. **Data de Nascimento (Filho)** __/__/__
5. **Grau de instrução:**

<input type="radio"/> Analfabeto	<input type="radio"/> Fundamental incompleto
<input type="radio"/> Fundamental completo	<input type="radio"/> 2° grau incompleto
<input type="radio"/> 2° grau completo	<input type="radio"/> Superior incompleto
<input type="radio"/> Superior completo	
6. **Onde mora:** _____
7. **Trabalha?** Sim Não
Tipo de atividade realizada? _____
8. **Já trabalhou no garimpo de ouro?**
 Sim Não
9. **Consome bebida alcóolica?**
 Sim Não
10. **Fuma?**
 Sim Não

APÊNDICE C – Otimização e validação do método de quantificação de mercúrio em leite materno

1. INTRODUÇÃO

Devido á sua toxicidade e capacidade de bioacumulação em vários organismos, a identificação de Hg em diversas matrizes tem gerado grande interesse (BARALKIEWCZ et al., 2005). Entretanto, a determinação desse metal em amostras biológicas, como leite humano, é complexa devido à suas baixas concentrações nestas matrizes (MORAES et al., 2013), o que tem impulsionado o desenvolvimento de métodos sensíveis para sua determinação (BARALKIEWCZ et al., 2005).

Várias são as técnicas utilizadas para determinação de Hg em amostras de leite humano (**Tabela 1**), contudo, por se tratar de um método barato, simples e limpo, técnicas de espectrometria atômica têm tido grande destaque (MADDEN & FITZGERALD et al., 2009), como espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (CVAAS) com um sistema de injeção em fluxo (FIMS) (VIEIRA, et al., 2013); e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) com mineralização ácida da amostra em banho de ultrassom (MORAES, et al., 2013).

Tabela 1 – Técnicas para determinação de mercúrio total em leite materno utilizadas em diferentes estudos.

Referência	Quantidade de amostra (mL)	Técnica para determinação de mercúrio total
Vieira et al., 2013	10	Espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio com um sistema de injeção em fluxo FIMS (CV-AAS, Perkin-Elmer - FIMS 400, Ueberlingen, Alemanha).
Cunha et al. 2013	2	Espectrometria de fluorescência atômica em um sistema 10.023 Merlin PSA (PS analítico, Kemsig, Sevenoaks, Reino Unido)
Al-Saleh et al., 2013**	5 – 10	Espectrofotometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (VGA-77 da Varian Techtron Pty. Ltd., Austrália)
Örün et al., 2012	NI*	Plasma acoplado à Espectrometro de Massa (usando um instrumento Agilent 7500A) e CEM MARS 5 Microwave digestão.
Goudarzi et al., 2012	25	Espectrofotometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (FIAS 4100, Perk in Elmer, Foster City, CA, USA)
Behrooz et al., 2012	10 – 20	Espectrometria de absorção atômica
Yalçın et al., 2010	5 – 10	NI*

Tabela 1 – Técnicas para determinação de mercúrio total em leite materno utilizadas em diferentes estudos – Continuação.

Referência	Quantidade de amostra (mL)	Técnica para determinação de mercúrio total
Bose-O'Reilly et al., 2008**	1,0	Espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (CV-AAS)
Chien et al., 2006	50	HG-200, Hiranuma, Mito, Japan
Da Costa et al., 2005	6	Espectroscopia de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio com um sistema de injeção em fluxo (FIMS)
Björnberg et al., 2005	5	CVAFS (Merlin, PSA 10.003; OS Analytical Ltd.)
Drexler e Schaller, 1998	NI*	Espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio
Drasch et al., 1998	5	Espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (CV-AAS)
Barbosa e Dórea, 1998	NI*	Espectrometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor frio (CV-AAS)

NI* – dado não informado.

Sobretudo, a determinação de Hg em leite humano é essencial na avaliação do impacto que a exposição a este metal pode causar a saúde da criança, bem como da necessidade de medidas que possam minimizar os riscos da população exposta. Dessa forma, este estudo objetivou a otimização de metodologia para determinação de mercúrio total por GFAAS em amostras de leite materno, utilizando nitrato de paládio e zircônio como modificadores químicos.

1.2. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE

A espectrometria atômica é uma ótima técnica para a determinação de metais em diversas matrizes e em amplo intervalo de concentração (BINGS et al., 2006). Nesta técnica, interações da radiação com a matéria são utilizadas na obtenção de informações a respeito da amostra de interesse (SKOOG, 2006).

Cada elemento possui número específico de elétrons associados a seu núcleo, encontrando-se em seu estado de energia mais baixo, denominado “estado fundamental”. Por meio de um estímulo, seja na forma de calor, energia elétrica, luz, entre outras, ele sofre uma transição para seu estado excitado, ou seja, seu estado de maior energia. Ao medir a radiação eletromagnética absorvida em função desta excitação (espectrometria de absorção), ou emitida quando o elemento retorna ao seu estado fundamental (espectrometria de emissão), é possível determinar a concentração de elementos em uma amostra (SKOOG et al, 2006).

A espectrometria de absorção atômica (*Atomic Absorption Spectrometry* - AAS) tem sido largamente utilizada em várias áreas científicas na determinação de elementos em diferentes matrizes. Nesta técnica, a radiação de comprimento de onda característico do analito é emitida e

parte desta é absorvida pelos átomos do analito, considerando que átomos livres gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação de frequência específica emitida por uma fonte espectral. Assim, sua concentração está relacionada à quantidade de radiação absorvida (BORGES et al., 2005).

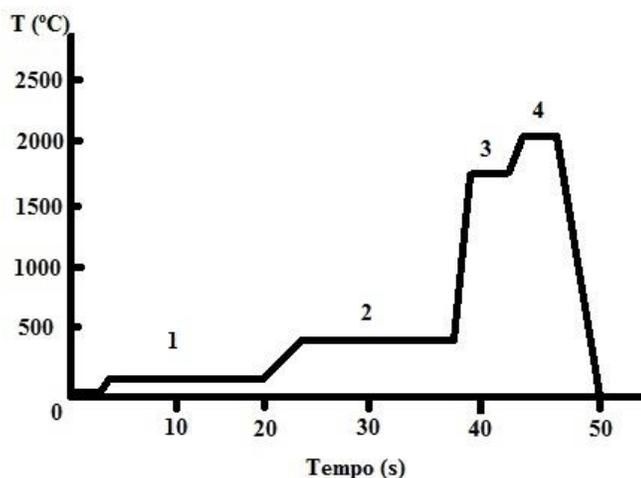
Na determinação de elementos por AAS utiliza-se a absorbância e a Lei de Beer-Lambert (lei de absorção). De acordo com a Lei de Beer-Lambert, ao atravessar um meio contendo um analito, a luz sofre um decréscimo de sua intensidade. Este decréscimo ocorre na proporção que o analito é excitado. Medindo-se a variação da quantidade de radiação incidente (P_0) com a transmitida (P), pode-se determinar quantitativamente o analito presente na amostra de interesse (SKOOG et al., 2006).

A relação P/P_0 indica a transmitância (T) da solução. Por sua vez, a absorbância (A) de uma solução segue uma relação linear com a concentração do analito, tendo que vista que a mesma se relaciona logaritmicamente com a transmitância, logo, $A = \log \frac{P}{P_0}$ (SKOOG et al., 2006).

Na espectrometria atômica, seja de absorção ou emissão, é necessária a conversão da amostra em átomos e íons em fase gasosa, para isso são utilizados os atomizadores. Dentre os tipos de atomizadores mais usados em AAS estão a chama e o forno de grafite, os quais são classificados como contínuo e discreto respectivamente, considerando a forma com que a amostra é introduzida no atomizador. Na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite a amostra é introduzida no tubo de grafite com o auxílio de uma micropipeta ou amostrador automático em um pequeno orifício no meio do tubo e posteriormente submetida a aquecimento progressivo, previamente programado, o qual ocorre pela passagem de uma corrente elétrica (SKOOG et al., 2006).

Este aquecimento deve ser feito de acordo com cada matriz a ser estudada e o elemento de interesse, o que demanda um estudo do programa de temperaturas a ser empregado, considerando a especificidade de cada análise. Um programa típico compreende três etapas (**Figura 1**): secagem, pirólise e atomização (FROES et al, 2006; MENDHAM, 2002).

Figura 1 – Programa de temperaturas típico de atomização forno de grafite (1 - secagem, 2 – calcinação ou pirólise, 3 - atomização, 4 – limpeza).



Fonte: Lajunen (1992) – Adaptado

A primeira etapa, de secagem, tem por objetivo a evaporação do solvente e com isso secagem da amostra. Para evitar o espalhamento e consequente diminuição de sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados não são utilizadas temperaturas muito altas nesta etapa, ocorrendo em temperaturas próximas ou superiores às temperaturas de ebulição do solvente. Na etapa de pirólise o objetivo é eliminar os componentes da matriz sem que haja perda do analito (SKOOG et al., 2006). Devido a complexidades de algumas matrizes e analitos, por vezes, são utilizados modificadores químicos, os quais alteram a química da amostra possibilitando a utilização de maiores temperaturas nesta fase (FROES et al, 2006; PEREIRA-FILHO et al., 2002).

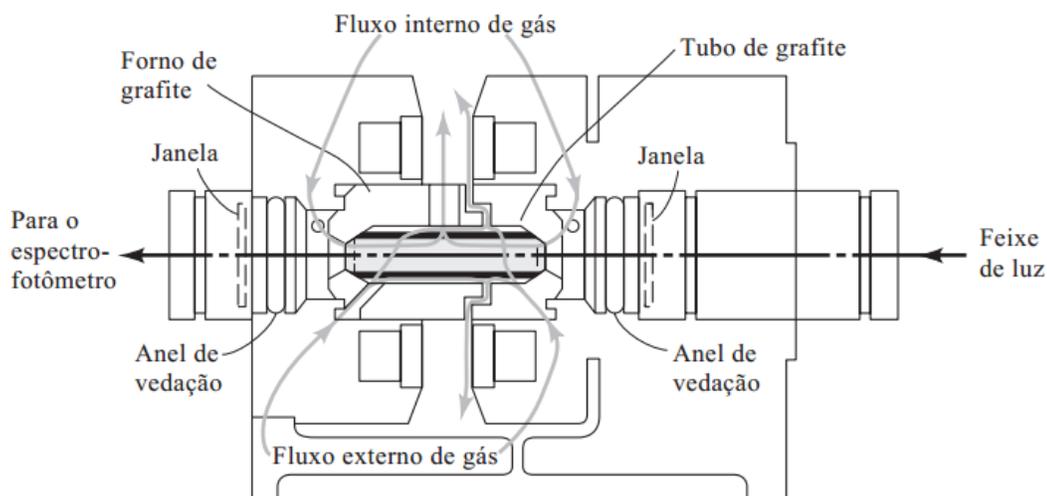
Na atomização as temperaturas são elevadas de forma que vapor atômico seja formado e o a absorção das partículas sejam medidas. Por fim, os restos de analito, não atomizado ou óxidos difíceis de vaporizar são eliminados por meio da elevação da temperatura, na etapa de limpeza (SKOOG et al., 2006; MENDHAM, 2002).

Um equipamento de GFAAS é composto por uma fonte de radiação, um sistema de introdução da amostra (amostrador automático e capilar com amostra), um sistema de atomização (tubo de grafite, potência de abastecimento do forno), um monocromador e um sistema de detecção. Por fim, os dados são processados por sistemas computadorizados.

O atomizador de forno de grafite (**Figura 2**) é composto por um tubo cilíndrico de grafite, aberto em suas duas extremidades para passagem da radiação e um orifício central para inserção da amostra. Dois contatos elétricos são mantidos em suas extremidades num compartimento refrigerado com água. Um fluxo de ar inerte é promovido na parte externa e interna do tubo a fim prevenir a entrada de ar e incineração do tubo, assim como para carregar os vapores gerados para fora do tubo. A amostra é inserida pelo orifício central diretamente na parede do tubo ou sobre uma plataforma L'vov, localizada abaixo do orifício de introdução da amostra (SKOOG et al., 2007; MENDHAM, 2002).

Análises por GFAAS permitem a utilização de pequenas quantidades de amostras (até 0,5 uL), além de ampliar a sensibilidade, quando comparada à espectrometria de absorção atômica com chama. Entretanto, é possível que haja efeitos de absorção do ruído de fundo e perda do analito na etapa de pirólise, principalmente quando se analisa compostos mais voláteis, como arsênio, selênio e mercúrio. Vários são métodos que buscam minimizar este ruído, dentre eles, os modificadores são comumente utilizados, tendo em vista que estes possibilitam o estabelecimento de condições isotérmicas no tubo retardando a atomização do analito evitando perdas (MENDHAM, 2002).

Figura 2 – Atomizador de forno de grafite.



Fonte: Skoog et al. (2006).

1.2.1. Modificadores químicos

Ediger, Peterson e Kerber, em 1974, introduziram o termo modificador de matriz, hoje denominado modificador químico, ao fazerem um estudo objetivando a determinação de Pb em água do mar (PINTO, 2004). Atualmente, modificadores químicos é uma importante ferramenta em análises por GFAAS, sendo comumente utilizada para a estabilização de analitos a altas temperaturas, redução de concomitantes, aumento do tempo de vida do tubo, assim como da sensibilidade na determinação de elementos mais voláteis (NAOZUKA et al., 2003; ORTNER et al., 2002; PEREIRA-FILHO et al., 2002).

A introdução do modificador químico pode ser feita de duas formas: antes, depois ou conjuntamente com a amostra no tubo de grafite, no caso da modificação química convencional; ou pode-se revestir a parede do tubo ou a plataforma L'vov com um elemento metálico que atuará como modificador químico permanente, o qual pode suportar vários ciclos de aquecimento (NAOZUKA et al., 2003).

Para ser considerado um bom modificador químico, o elemento deve estabilizar o analito a, pelo menos, 1.000° C, garantindo a total eliminação da matriz durante a pirólise; ser raramente determinado por GFAAS evitando contaminação; não diminuir a vida útil do tubo de grafite; ser mais universal possível; não afetar negativamente a sensibilidade da técnica ou causar alta absorção de fundo (FROES et al, 2006).

Vários compostos são utilizados como modificadores. Os elementos mais utilizados são aqueles do grupo da platina, Pt, Ir, Ru e Rh, e elementos formadores de carbetos, tais como Nb, Ta, Zr e W (KRATA et al., 2007).

No caso da determinação de mercúrio, a utilização de metais nobres está bem estabelecida (KRATA et al., 2007). O paládio é amplamente utilizado neste tipo de análise. Madden e Fitzgerald (2009) utilizaram este elemento para melhorar o limite de detecção do método de quantificação de mercúrio. Silva et al. (2002), investigaram a utilização de Ir, Pd, Rh e Ru como modificadores permanentes para determinação de mercúrio em diferentes matrizes (cinza, lodo e sedimentos) por GFAAS. Apesar do estudo não deixar evidente a vantagem no uso de um modificador para todas as amostras, o paládio apresentou melhor consistência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, sendo que todas as soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), obtida pelo sistema PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater (Saint Maurice, França). As vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica utilizados foram descontaminados por meio de imersão em ácido nítrico 10% (v/v) por 24h. Após este procedimento o material foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. Nesta etapa do trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e soluções:

- Ácido nítrico, HNO_3 , 69-70% (J.T. Baker);
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 95-98% (J.T. Baker);
- Nitrato de paládio, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, (Merck);
- Nitrato de zircônio, $\text{ZrO}(\text{NO}_3).2\text{H}_2\text{O}$, (Merck);
- Peróxido de hidrogênio 30%, H_2O_2 (Merck KGaA);
- Solução padrão de mercúrio 1.000 mg L^{-1} (Merck).

2.2. EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Amostrador automático ASC-6100;
- Bloco digestor;
- Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800;
- Sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite GFA-EX7;
- Vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica.

2.3. COLETA DE LEITE MATERNO

As amostras de leite materno (aproximadamente 100 mL) foram coletadas pelas próprias lactantes, por ordenha manual, em frascos de vidro esterilizados (**Figura 5**). Após a coleta as amostras foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Bioanalítica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu-SP, onde foram mantidas a -25°C até o momento das análises.

2.4.DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL POR GFAAS

2.4.1. Mineralização das amostras de leite humano

As amostras de leite foram descongeladas a temperatura ambiente e posteriormente 500 µL de amostra de leite foram transferidos para um tubo de ensaio de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução de ácido nítrico concentrado (HNO₃) e mantido sob aquecimento por cerca de 1 hora a 60° C até que a amostra estivesse completamente digerida. Finalmente o volume foi ajustado em balão volumétrico de 5 mL com água ultrapura.

2.4.2. Determinação de mercúrio total em leite materno

As concentrações de HgT nos extratos ácidos obtidos no processo de mineralização das amostras de leite materno foram determinadas utilizando espectrômetro de absorção atômica (SHIMADZU AA-6800) com amostrador automático (ASC-6100) e sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFA-EX7).

Seguiu-se o procedimento descrito por Moraes et. al (2013), onde utilizou-se lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 nm. Manteve-se fluxo constante de 1 L min⁻¹ de argônio (gás inerte) durante todo o programa, interrompendo-se seu fluxo apenas na etapa de atomização.

No intuito de prolongar a vida útil dos tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada, utilizados nas determinações de HgT, suas paredes internas foram recobertas com zircônio. Este procedimento permite também maior estabilização térmica do mercúrio (ORTNER et al., 2002). Dessa forma, alíquotas de 25 µL de solução contendo 1.000 mg L⁻¹ do modificador nitrato de zircônio foram injetadas dentro do atomizador, com aquecimento até 500° C. Também foi utilizado como modificador químico em solução 1.000 mg L⁻¹ de nitrato de paládio co-injetado com a amostra dentro do atomizador para auxiliar no processo de estabilização térmica do Hg.

Os sinais e absorbância foram medidos em área de pico e em triplicata, injetando-se alíquotas de 20 µL das soluções padrões e/ou amostras mineralizadas juntamente com 4 µL do modificador nitrato de paládio para dentro do tubo de grafite recoberto com carvão de zircônio, utilizando-se micropipeta do autoamostrador. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de HgT nestas amostras está apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Programa de aquecimento do tubo de grafite para determinação de HgT nos extratos ácidos obtidos das mineralizações das amostras de leite in-natura, extrato proteico.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	250	5	5	1
Pirólise	600	5	10	1
Atomização	1600	2	5	0
Limpeza	1800	5	0	1

Fonte: Moraes et al. (2013) – adaptado.

2.4.2.1. Preparo da Curva Analítica

Para determinação do HgT por espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), foi construída curva analítica no intervalo de concentração 0,25 – 1,50 µg L⁻¹. Para o preparo desta curva utilizou-se solução padrão de 10 µg L⁻¹ de Hg, obtida por diluição de solução padrão de 1.000 mg L⁻¹. Para a obtenção dos padrões de mercúrio, alíquotas de 2,5, 5, 10 e 15 mL, da solução padrão contendo 10 µg L⁻¹ de mercúrio foram diluídas para 50 mL em balão volumétrico a fim de se obter o intervalo de concentração da curva analítica.

2.4.3. Validação do método

A validação do método foi feita utilizando-se como amostra o padrão certificado DORM-4 NRC (Fish Protein) contendo 0,410 ± 0,055 mg kg⁻¹ de mercúrio total, preparado nas mesmas condições descritas para as amostras de leite materno, utilizando-se no entanto 50 mg do padrão certificado. Após o processo de mineralização, o extrato ácido foi transferido para balão volumétrico de 5 mL e o volume acertado com água ultrapura, obtendo-se assim concentração de mercúrio 4,1 10⁻³ mg L⁻¹ ou 4,1 µg L⁻¹. Essa solução foi diluída cinco vezes, obtendo-se concentração final 0,82 µg L⁻¹, concentração esta dentro do intervalo da curva analítica utilizada no experimento.

A confiabilidade do método proposto também foi testada procedendo-se determinações em soluções das amostras mineralizadas de leite materno enriquecidas com 0,50 µg L⁻¹ de padrão de mercúrio. Para isso, volumes de 500 µL do padrão de 1 µg L⁻¹ de mercúrio foram misturados com 500 µL dos extratos obtidos na etapa de mineralização das amostras de leite materno e submetidos novamente ao processo mineralização, acrescentando-se 1 mL de solução de ácido

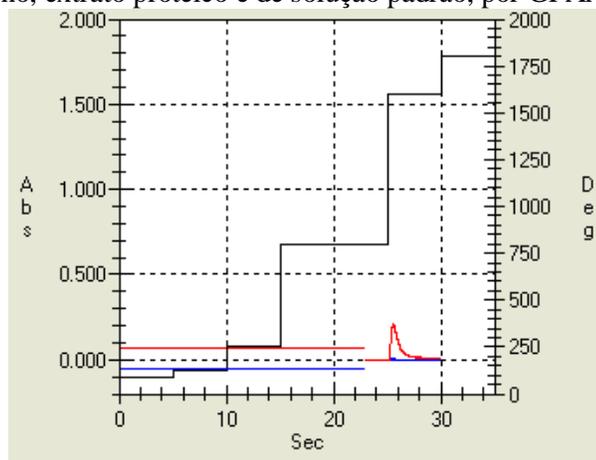
nítrico concentrado. Após total eliminação de NO_2 , (o extrato fica totalmente transparente), completaram-se os volumes das soluções enriquecidas para 5 mL com água ultra pura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Em análises por GFAAS, as temperaturas de pirólise e atomização exercem influência na sensibilidade do método, portanto a otimização do programa de temperatura é essencial para obtenção de resultados analíticos exatos e reprodutivos (MORAES et al., 2013). Tendo em vista o exposto, primeiramente foram construídas curvas de pirólise e de atomização para determinar temperaturas ótimas do metal de interesse (mercúrio), isso tanto nas soluções padrão, quanto para as amostras de leite in-natura. Assim, o programa de aquecimento foi otimizado para se obter temperaturas de pirólise e de atomização que mantivessem o mercúrio termicamente estável em soluções padrão contendo $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg e 100mg L^{-1} de Pd(II). Nesse experimento foram utilizados tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de zircônio, que atuou como modificador permanente e as condições de preparo das amostras descritas na parte experimental. A influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre sinal de absorvância obtido para a solução padrão de $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg é mostrada na **Figura 4**.

Figura 4 – Programa de aquecimento otimizado para determinação de mercúrio total nos extratos ácidos das amostras de leite materno, extrato proteico e de solução padrão, por GFAAS.



A temperatura de pirólise de 600°C e de a atomização de 1.600°C , foram escolhidas porque conforme mostra a **Figura 4**, os sinais de absorvância obtidos para a solução padrão de

0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg permaneceu constante de 250° C (temperatura de secagem) até 600° C, sofrendo um rápido decréscimo no tempo de 22 segundos e estabilizando-se novamente entre 26 e 28 segundos na temperatura de 1.600° C (temperatura de atomização). A partir de 28 segundos, após o aumento da temperatura para 1.800° C, temperatura da etapa de limpeza, observa-se um decréscimo rápido e significativo no sinal de absorvância, indicando que nessa temperatura obteve-se uma limpeza eficaz do tubo de grafite. Pode-se observar também, que em todo processo de pirólise e atomização, os sinais de absorção de fundo foram baixos.

Outro importante fator que influencia na obtenção de bons resultados é o uso, ou não, de modificadores químicos. Na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, modificadores químicos são comumente utilizados para estabilizar o analito a altas temperaturas, possibilitando o uso de temperaturas de pirólise mais elevadas, além de aumentar a volatilidade dos concomitantes diminuindo as interferências provocadas pelos mesmos (FROES et al., 2006; NAOZUKA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA-FILHO et al., 2002). Neste estudo, nitrato de zircônio e nitrato de paládio foram utilizados como modificadores químicos. A estabilidade térmica do mercúrio observada nos experimentos indica a eficiência desses modificadores.

3.2. OBTENÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Utilizando os parâmetros otimizados (pirólise e temperatura de atomização), uma curva analítica para o mercúrio foi construída nas concentrações de 0,25, 0,50, 1,00 e 1,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva apresentou a seguinte equação de reta (**Equação 1**):

$$C_{(Hg)} = A - \frac{0,00091}{0,082}; r = 0,9996 \quad (1)$$

sendo A = sinal de absorvância medido.

Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos padrões de mercúrio (n=6) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativos menores que 2%, coeficiente de correlação linear, $r = 0,9996$). Esta curva permitiu o cálculo do limite de detecção dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), os quais foram calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e

da inclinação da curva analítica ($LOD = 3\sigma/\text{slope}$ e $LOQ = 10\sigma/\text{slope}$). O LOD e LOQ foram respectivamente 51 e 154 ng L^{-1} de mercúrio.

O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 980 queimas. Esse valor é cerca de duas vezes superior ao obtido pela metodologia proposta por Moraes et. al (2013) para determinação de mercúrio em amostras de músculo de peixe. Os resultados obtidos confirmam a eficiência do Pd(II), utilizada como modificador químico e o filme carbeto de zircônio utilizado como modificador permanente na estabilização térmica do mercúrio durante a etapa de pirólise e atomização do programa de aquecimento proposto.

3.3.VALIDAÇÃO DO MÉTODO E DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL NAS AMOSTRAS

Otimizados os parâmetros do processo de extração e quantificação por GFAAS, o método proposto foi utilizado para determinação das concentrações de mercúrio de leite materno. A **Tabela 3** apresenta as concentrações de mercúrio total obtidas nas amostras de leite e os resultados obtidos nos experimentos de validação. A confiabilidade do método proposto para a determinação de mercúrio total em amostras de leite foi testado por determinação de mercúrio em padrão certificado DORM-4 NRC (Fish Protein) e por meio de experimentos de recuperação em soluções enriquecidas das amostras de leite materno.

Tabela 3 – Concentrações de mercúrio total em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia e dos experimentos de validação do método proposto utilizando padrão certificado e soluções enriquecidas (*spike*) das amostras de leite.

Amostras Comunidades/RM*	Lactantes	Hg _{Total} - Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg _{Total} -Spikes Teórico* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg _{Total} -Spikes Experimental ($\mu\text{g L}^{-1}$)	**Hg _{Total} -RM (mg kg^{-1})
Abunã	1	4,60±0,09	0,56±0,011	0,54±0,019	-
Abunã	2	3,70±0,03	0,45±0,0036	0,43±0,016	-
Abunã	3	7,10±0,04	0,81±0,0046	0,79±0,029	-
Vila Jirau	4	5,51±0,08	0,65±0,0094	0,62±0,022	-
Abunã	5	7,40±0,01	0,84±0,0014	0,82±0,031	-
Fortaleza do Abunã	6	6,71±0,03	0,77±0,0034	0,73±0,027	-
Fortaleza do Abunã	7	6,44±0,03	0,74±0,0034	0,71±0,025	-
Nova Mutum Paraná	8	5,66±0,02	0,67±0,0023	0,69±0,026	-
Vila Jirau	9	5,51±0,01	0,65±0,0018	0,67±0,024	-

Tabela 3 – Concentrações de mercúrio total em amostras de leite materno de lactantes residentes em comunidades do alto rio Madeira, Rondônia e dos experimentos de validação do método proposto utilizando padrão certificado e soluções enriquecidas (*spike*) das amostras de leite – Continuação.

Amostras Comunidades/RM*	Lactantes	Hg _{Total} - Amostras ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg _{Total} -Spikes Teórico* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg _{Total} -Spikes Experimental ($\mu\text{g L}^{-1}$)	**Hg _{Total} -RM (mg kg^{-1})
NIST 8414	-	-	-	-	0,402±0,014

*Concentração calculada utilizando a equação: $C_1 \cdot V_1 + C_2 \cdot V_2 / V_{\text{final}}$, onde, C_1 e V_1 representam a concentração e o volume da solução padrão de $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, C_2 e V_2 representam a concentração de Hg no extrato das amostras e volume do extrato das amostra e V_{final} representa o volume final das misturas das soluções.

**Hg_{Total} -RM; Valor certificado = $0,410 \pm 0,055 \text{ mg kg}^{-1}$

Analisando-se os resultados apresentados na tabela anterior (**Tabela 3**), observa-se que as porcentagens de recuperação obtidas por meio da adição de Hg nas amostras de leite, entre 95 e 103%, foram boas. Assim como o resultado obtido do padrão certificado está bem próximo do valor certificado ($0,410 \pm 0,055 \text{ mg kg}^{-1}$). Resultados estes, que comprovam a exatidão e precisão do método proposto.

4. CONCLUSÕES

O procedimento de digestão ácida proposto possibilitou completa mineralização das amostras de leite, permitindo a determinação de mercúrio total por GFAAS. Foi possível verificar também que a utilização de nitrato de paládio e carbeto de zircônio como modificadores químicos associados se mostrou eficiente na estabilização térmica do mercúrio, possibilitando a determinação de mercúrio em níveis de ppb.

Além disso, os resultados alcançados nas determinações de mercúrio no padrão certificado se mostram precisos e exatos, o que qualifica o método proposto para determinação de mercúrio em amostras de leite materno.

REFERÊNCIAS

AL-SALEH, I.; ABDULJABBAR, M.; AL-ROUQI, R.; ELKHATIB, R.; ALSHABBAHEEN, A.; E SHINWARI, N. Mercury (Hg) Exposure in Breast-Fed Infants and Their Mothers and the Evidence of Oxidative Stress. **Biol Trace Elem Res**, v. 153, p. 145–154, 2013.

BARALKIEWICZ, D.; GRAMOWSKA, H.; KÓZKA, M.; KANECKA, A. Determination of mercury in sewage sludge by direct slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, n. 3, p. 409–413, mar. 2005.

BARBOSA, A. C.; DÓREA, J. G. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 71–79, out. 1998.

BEHROOZ, R. D.; ESMAILI-SARI, A.; PAR, F. E.; AMINI, M. Mercury Concentration in the Breast Milk of Iranian Women. **Biol. Traço Elem. Res.**, v. 147, p. 36-43, 2012.

BINGS, N. H.; BOGAERTS, A.; BROEKAERT, J. A. C. Atomic Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3917-3945, 2006.

BJÖRNBERG, K. A.; VAHTER, M.; BERGLUNG, B.; NIKLASSON, B.; BLENNOW, M.; ENGLUNG, G. S. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. **Environ Health Perspect**, v. 113, p. 1381–1385, 2005.

BORGES, D. L. G.; CURTIUS, A. J. C.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, n. 18, ago-set, 2005.

BOSE-O'REILLY, S.; LETTMEIER, B.; ROIDER, G.; SIEBERT, U.; DRASCH, G. Mercury no leite materno – Um perigo para a saúde para crianças em áreas de mineração de ouro? **Internation Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, p. 615–623, 2008.

CHIEN, L-C.; HAN, B-C.; HSU, C-S.; JIANG, C-B.; YOU, H-J.; SHIEH, M-J.; YEH, C-Y. Analysis of the health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. **Chemosphere**, v. 64, p. 79–85, 2006.

CUNHA, L. R.; COSTA, T. H. M., e CALDAS, E. D. Mercury Concentration in Breast Milk and Infant Exposure Assessment During the First 90 Days of Lactation in a Midwestern Region of Brazil. **Biol Trace Elem Res**, v. 151, n. 1 p. 30–37, jan. 2013.

DA COSTA, S. L.; MALM, O.; DÓREA, J. G. Breast-Milk Mercury Concentrations and Amalgam Surface in Mothers from Brasília, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 106, p. 145-151, 2005.

DRASCH, G.; AIGNER, S.; ROIDER, G.; STAIGER, F.; LIPOWSKY, G. Mercury in Human Colostrum and Early Breast Milk. Its Dependence on Dental Amalgam and other Factors. **Journal of Trace Elements in Medicine Biology**, v. 12, p. 23 -27, 1998.

DREXLER, H. and SCHALLER, KH. The Mercury Concentration in Breast Milk Resulting from Amalgam Fillings and Dietary Habits. **Environmental research, section A**, v. 77, p. 124-129, 1998.

FROES, R.E.S.; WINDMÖLLER, C.C.; DA SILVA, J.B.B. Emprego da Modificação Química Permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. **Revista analítica**, n.23, p.32-43, jul. 2006.

GOUDARZI, MA.; PARSAEI, P.; NAYEBPOUR, F.; RAHIMI, E. Determination of mercury, cadmium and lead in human milk in Iran. **Toxicology and Industrial Health**, 2012. Disponível em: < <http://tih.sagepub.com/content/early/2012/04/25/0748233712445047>>. Acesso em 18 de Abril de 2014.

KRATA, A.; JEĐRAL, W.; BULSKA, E. On the uniforming of the atomization process for inorganic and organic mercury in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** 62, v. 62, n. 3, p. 269-272, mar. 2007.

LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission, **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 342p., 1992.

MADDEN, J. T.; FITZGERALD, N. Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, n. 9, p.925–927, set. 2009.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Vogel Análise química 114anadian114ive**. Rio de Janeiro : LTC, 2002.

MORAES, P.M.; SANTOS, F.A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C.C.F.; VIEIRA, J.C.S; ROLDAN, P.S.; PADILHA, P.M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, n.3, p. 2614-2617, dez.2013.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P.V.; PEDROTTI, J.J. Eletrodeposição de irídio em tubo de grafite como modificador químico permanente em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v.26, n.6, p.934-937, mar. 2003.

OLIVEIRA, A.P; GOMES NETO, J.A; FERREIRA, M. M. C. Uso da análise exploratória de dados na avaliação de modificadores químicos para determinação direta e simultânea de metais em álcool combustível por GFAAS. **Eclética química**, v.31, n.1 p.7-12, 2006.

ORTNER, H.M.; BULSKA, E.; ROHR, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUCH, S.; WELZ, B. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review). **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, n.12, p. 1835–1853, dez. 2002.

ÖRÜN, E.; YALÇIN, S. S.; AYKUT, O.; ORHAN, G.; KOÇ-MORGIL, G.; YURDAKÖK, K.; UZUN, R. Mercury exposure via breast-milk in infants from a suburban area of Ankara, Turkey. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 54, p. 136-143, 2012.

PEREIRA-FILHO, E.R.; POPPI, R.J.; ARRUDA, M.A.Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, MO e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v.25, n.2, p.246-253, jul. 2002.

PINTO, F. G.; ANDRADA, D.; MAGALHÃES, C. G.; NUNES, B. R.; AMORIM, F. R.; FRANCO, M. B.; SAINT PIERRE, T. D.; SILVA, J. B. B.; CURTIUS, A. J.; Determination of selenium in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium plus rhodium with co-injection of rhodium as chemical modifiers. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 825, 2005.

SILVA, C. A.; TESSIER, E.; KÜTTER, V. T.; WASSERMAN, J. C.; DONARD, O. F. X.; SILVA-FILHO, E. V. Mercury speciation in fish of the cabo frio upwelling region, SE – Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 3, p. 259-266, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

VIEIRA, S. M; ALMEIDA, R.; HOLANDA, I. B. B.; MUSSY, M. H.; GALVÃO, R. C. F.; CRISPIM, P. T. B.; DÓREA, J. G. BASTOS, W. R. Total and methyl-mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the Rio Madeira, Amazon, Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 6, p. 682-689, nov. 2013.

YALÇIN SS, YURDAKÖK K, YALÇIN S, ENGÜR-KARASIMAV D, COŞKUN T. Maternal and environmental determinants of breast-milk mercury concentrations. **Turk J Ped.** v. 52, p. 1-9, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 038/2010.

Título: "Aproveitamento hidrelétrico Jirau (AHE Jirau, estado de Rondônia): programa de monitoramento hidrobiogeoquímico do mercúrio e de riscos à saúde humana".

Pesquisador Responsável: Carlos José Sousa Passos.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 30/04/2010.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 09/06/2010.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 02/08/2010.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "*ad referendum*", conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para até 10 de fevereiro de 2011.

Brasília, 06 de Agosto de 2010

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB